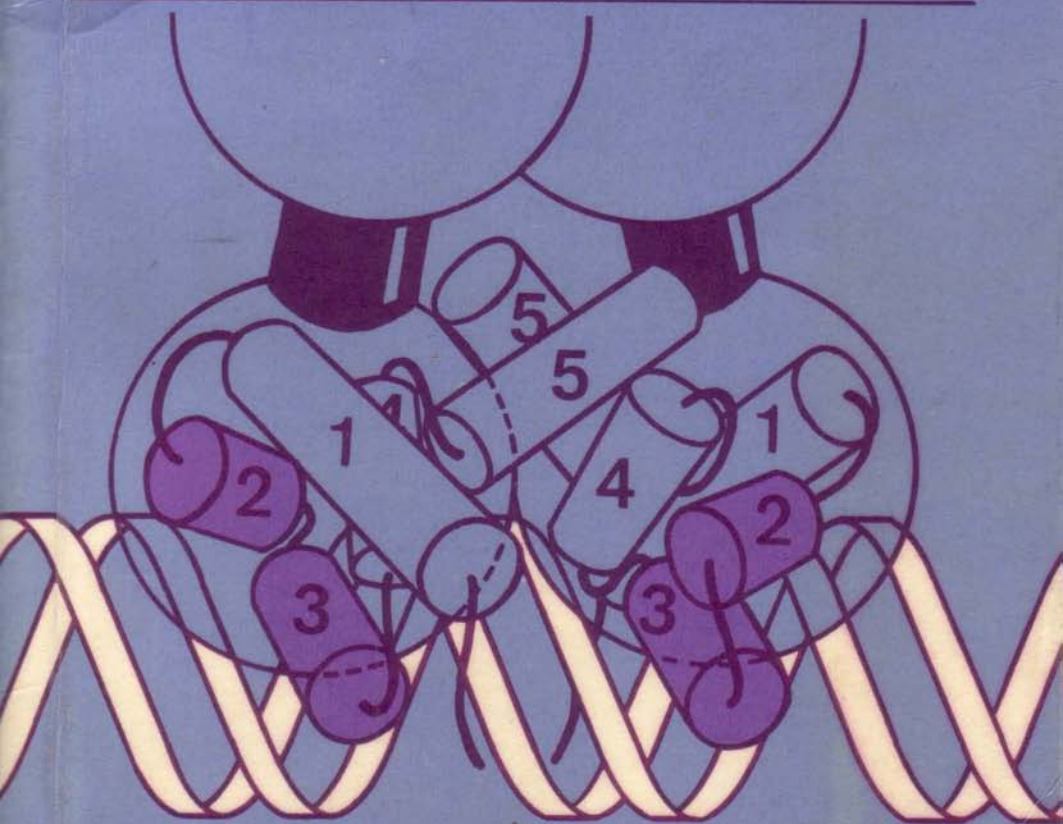


М. Пташне

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ ГЕНОВ

Регуляция генной активности
и фаг λ



Издательство „Мир”

Переключение генов.

Регуляция генной активности и фаг λ

A GENETIC SWITCH

Gene Control and Phage λ

by Mark Ptashne
Harvard University

Published by Cell Press
and Blackwell Scientific Publications

М. Пташне

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ ГЕНОВ

Регуляция генной активности
и фаг λ

Перевод с английского
канд. биол. наук **А. М. Колчинского**

под редакцией
д-ра физ.-мат. наук **М. Д. Франк-Каменецкого**



Москва «Мир» 1988

ББК 28.04
П87
УДК 57.023

Пташнe М.

**П87 Переключение генов. Регуляция генной активности
и фаг λ: Пер. с англ.—М.: Мир, 1989.—160 с., ил.
ISBN 5-03-000854-3**

В книге, написанной одним из крупнейших американских молекулярных биологов, рассматривается механизм регуляции генной активности. Освещены последние достижения в этой быстро развивающейся области, не нашедшие еще отражения в учебниках и монографиях. По стилю изложения книга близка к обзорам, публикуемым в журнале «В мире науки» (Scientific American).

Для биохимиков, молекулярных биологов, генетиков, микробиологов специалистов в области биотехнологии, для студентов и преподавателей биологических факультетов.

П $\frac{2001040000-016}{041(01)-89}$ 137-88, ч.1

ББК 28.04

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-000854-3 (русск.)
ISBN 0-86542-315-6 (англ.)

© 1986 and 1987, by Blackwell Scientific
Publications and Cell Press
© перевод на русский язык, «Мир»,
1988

От редактора перевода

Книга Марка Пташне «Переключение генов» принадлежит к особому жанру. Безусловно, это монография. В ней подведен итог более чем 20-летним исследованиям автора, но сделано это в популярной форме, доступной самому широкому кругу читателей. Это, а также чрезвычайная актуальность темы, делает предлагаемую вниманию советского читателя книгу явлением уникальным. Ведь в этой маленькой по объему книжке речь идет о центральном, узловом вопросе молекулярной биологии: как регулируется работа генов? Пташне дает ответ на этот вопрос для случая регуляции генов у бактериофага λ , которым он сам занимался. Ему удалось разобраться в этой проблеме самым исчерпывающим образом, буквально вплоть до атомного уровня. Книга в целом звучит, как патетическая симфония во славу молекулярной биологии.

Но насколько пример с фагом λ типичен? Можно ли переносить полученные данные на бактерии и тем более на высшие организмы? Этот вопрос затронут и в самой книге, но особенно оживленно стал обсуждаться в научной литературе уже после выхода английского оригинала книги в 1986 г. Надо сказать, что сама книга и опубликованный параллельно обзор в *Nature*, **322**, 6081, p. 698–701, 1986 имели очень большой резонанс в широких кругах молекулярных биологов. Концепция Пташне об общем принципе регуляции генов у всех живых организмов нашла очень много сторонников и, что более существенно, уже получила ряд подтверждений. Это многократно увеличивает общебиологическое значение материала, столь блестяще изложенного автором.

М. Д. Франк-Каменецкий

Предисловие

Эта книга посвящена одному из простейших организмов – вирусу, который размножается в бактерии. В ней описаны результаты 25-летних исследований вопроса о том, как этот вирус – фаг лямба (λ) – использует свои гены, т. е. свою ДНК, для роста и размножения.

Уместно спросить: почему на исследование одного-единственного вируса было потрачено столько усилий? В конце концов, любое явление в биологии хотя бы отчасти случайно и уникально. Функционирование любого организма определяется его эволюционной историей, и детальное описание того или иного процесса, протекающего в данном организме, не обязательно полностью приложимо к другому организму. Ответ на заданный вопрос следует искать в контексте основополагающего биологического процесса – развития.

Вкратце, проблема состоит в следующем. Все клетки индивидуального организма наследуют одну и ту же информацию, закодированную в ДНК, и тем не менее в ходе развития высшего организма из оплодотворенного яйца формируется огромное разнообразие различных типов клеток. В основе этого процесса лежит выборочное использование генов – явление, которое мы называем регуляцией генов. На разных стадиях развития клетки, руководствуясь отчасти внешними сигналами, избирательно используют тот или иной набор генов и следуют по тому или иному пути развития. Какие же молекулярные механизмы определяют выбор пути?

Моделью для изучения этой проблемы служит жизненный цикл фага λ : вирус избирает определенный путь развития в зависимости от внеклеточных сигналов, и мы достаточно подробно знаем, какие молекулярные взаимодействия определяют эти процессы. Мы полагаем, что аналогичные взаимодействия лежат в основе многих процессов развития и что идеи, возникающие при детальном описании частного случая фага λ , приложимы к другим системам, хотя, конечно, ни один другой организм не совпадает в точности с фагом λ .

Во введении к этой книге изложены основные представления о генах и их функционировании. Его цель – сообщить

читателю минимальное количество сведений по молекулярной биологии, необходимое для понимания первых трех глав.

В этих главах описан процесс развития фага λ с различной степенью детализации: сначала дана общая картина событий, происходящих в ходе взаимодействия между вирусом и бактерией-хозяином; затем в общих чертах описаны взаимодействия между молекулами, определяющие ключевые этапы этого процесса; и наконец, молекулярные взаимодействия рассмотрены более детально. Основные концепции на всех уровнях рассмотрения даны в готовом виде, без объяснения экспериментов, на основе которых они были сформулированы. Там, где это возможно, проведены параллели между имеющимися представлениями о развитии фага λ и процессах развития и регуляции генов у других организмов.

Гл. 4, в отличие от первых трех глав, посвящена описанию ряда ключевых экспериментов. Сами эти эксперименты и их интерпретацию легче воспринять, зная ответы, приведенные в первых трех главах.

Читатель убедится, что в настоящее время мы вполне понимаем многие аспекты регуляции генов фага λ . Имеющаяся целостная картина согласуется с экспериментальными наблюдениями и — что еще важнее — предсказывает результаты новых экспериментов. Такой высокой степени надежности и достоверности удалось достичь, в частности, благодаря тому, что большинство наших моделей основано на целой системе экспериментов, проведенных как в пробирке, так и в живой клетке, а не на единичных наблюдениях.

Таким образом, книга в целом служит иллюстрацией того, как биохимические и генетические эксперименты позволяют составить представление о части окружающего нас мира. Я отказался от исторического подхода; чтобы описать, как развивались наши представления, понадобилось бы совсем другое, гораздо более пространное введение.

Одна из привлекательных черт молекулярной биологии состоит в том, что ответы на фундаментальные вопросы, которые она дает, в большинстве случаев очень наглядны и их можно проиллюстрировать с помощью простых рисунков. Лишь в редких случаях приходится прибегать к абстрактным идеям. Наша цель состоит в том, чтобы понять, как осуществляется регуляция генов на основе взаимодействия между различными молекулами. Иногда достаточно просто взглянуть на эти молекулы, чтобы составить представление о том, как они работают, по их характерной форме или размерам. Отнеситесь, пожалуйста, со вниманием к рисункам, приведенным в книге, но имейте в виду, что они отражают лишь наши сегодняшние взгляды. Я уверен, что в дальнейшем, по мере углубления наших знаний, их придется существенно изменить.

Я хотел бы поблагодарить за дружеские советы студентов Гарвардского университета и коллег из моей лаборатории, а также Элисон Коуви, Ника Козарелли, Норма Дэвидсона, Хэтча Иколза, Гари Гуссина, Герхарда Хоксчайлда, Вилла Мак-Клуе, Русса Маурера, Говарда Нэша, Джеффа Робертса, Боба Шлейфа, Хэмма Смита, Джона Степлза, Джима Уотсона, Адама Уилкинса, Кейта Ямамото, Майкла Ярмолински, Патрицию Зандер и особенно Санди Джонсон. Идею написания этой книги подал мне Бернард Хирт.

Особенно важную роль в том, что эта книга увидела свет, сыграли три человека: Бен Льюин направлял всю работу по изданию книги, проявляя чувство стиля и понимание проблемы; Кэрол Морита быстро подготовила впечатляющие иллюстрации; Кэрол Нипперт несколько раз перепечатывала рукопись, решала организационные вопросы, и делала все это великолепно.

Январь 1986 г.

Марк Пташине
Кембридж, Массачусетс

Введение

Около 40 лет назад Андре Львов и его коллеги в Пастеровском институте в Париже описали поразительное свойство одного штамма обычной кишечной бактерии *Escherichia coli*: в результате облучения умеренной дозой ультрафиолетового света эти бактерии перестают расти и примерно через 90 мин лизируются (разрушаются), высвобождая в культуральную среду множество вирусных частиц, которые назвали λ -фагами. Такие вирусы называют также бактериофагами, т. е. пожирателями бактерий, или просто фагами. Высвободившиеся λ -фаги заражают новые бактерии и таким образом размножаются. Многие зараженные бактерии вскоре тоже лизируются, высвобождая новые фаговые частицы, но некоторые из них выживают и несут фаг λ в латентной форме. Эти бактерии нормально растут и делятся, пока культуру не облучат еще раз; тогда каждая из этих бактерий, подобно исходным, лизируется и дает новый урожай фаговых частиц. На рис. 1 представлены электронные микрофотографии вирусных частиц и клетки-хозяина.

Львов и его коллеги Франсуа Жакоб и Жак Моно поняли, что это переключение двух состояний вируса — латентной формы в делящейся бактерии и активированной формы в облученной бактерии — простая модель одного из основных биологических процессов: включения и выключения генов.

Гены определяют структуру всех молекул, из которых состоят живые клетки. В каждый момент любая клетка, от бактериальной до человеческой, использует лишь часть своих генов для образования различных молекул. Мы говорим, что эти экспрессирующиеся гены *включены*, а те, что не экспрессируются, *выключены*. Другими словами, мы полагаем, что экспрессия генов регулируется.

Рассмотрим в качестве примера развитие особи из оплодотворенного яйца. Эта клетка, равно как и ее потомки, делится, и данный процесс повторяется миллионы раз; при этом каждая новая клетка получает идентичный набор генов. Тем не менее одни клетки (например, те, из которых состоят волосы) выглядят и функционируют совершенно иначе, чем



Рис 1 Электронная микрофотография частиц фага λ и бактерии *E. coli* зараженной этим фагом. Диаметр головки фага около 600 Å, увеличение на верхнем снимке 100 000, на нижнем 8 000. Фотографии любезно предоставлены Роджером Хендриком.

другие (например, клетки кожи), поскольку в разных клетках включены разные гены. Самое главное, что гены передаются от родительских клеток к потомству без изменений (за редким исключением), но при этом они могут по-разному экспрессироваться в разных клетках.

Экспрессия гена регулируется не только в ходе развития, но также и в течение жизни дифференцированной клетки. Например, клетки кожи меняют свой цвет под действием солнечного света. Структура гена, отвечающего за пигментацию, не изменяется в ответ на освещение; просто внеклеточный сигнал, свет, включает этот ген. Еще один пример регуляции генов: раковые клетки делятся в таких условиях, когда деление соответствующих нормальных клеток не происходит. Одна из причин состоит в том, что некоторые гены в этих клетках включены (или выключены), тогда как они не должны (или, наоборот, должны) работать.

Биологи давно хотели узнать, как включаются и выключаются гены при нормальном развитии и как нарушается их регуляция при тех или иных заболеваниях. Нас интересуют молекулярные механизмы регуляции генов и объединение этих механизмов в систему, обеспечивающую упорядоченное включение и выключение групп генов. Мы хотим понять, какие стадии в этой системе регулируются внутриклеточными программами, а какие – внеклеточными сигналами.

Возвращаясь к исходному примеру – фагу λ , мы можем теперь отдать должное прозорливости первопроходцев, которые распознали в росте этого вируса, и прежде всего в его способности идти по двум путям развития, удобный для исследования пример регуляции экспрессии генов. Бактерии и их фаги быстро размножаются, благодаря этому регуляцию их генов можно изучать с помощью генетических и биохимических подходов гораздо более эффективно, чем регуляцию генов в клетках высших организмов. Теперь рассмотрим кратко, что представляют собой гены и как они работают.

Начнем со структуры гена, участка молекулы ДНК, который сам по себе инертен, но несет информацию, закодированную в виде последовательности оснований в двух цепях. Четыре основания, входящие в состав молекулы ДНК, – аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С) – присоединены к двум взаимно переплетающимся остовам, причем А одной цепи всегда спарен с Т другой, а G всегда спарен с С.

На рис. 2 приведены три схематических изображения отрезка молекулы ДНК. На верхней схеме последовательность из 24 пар оснований записана в две строки, так что основания в верхней строке входят в состав одной цепи ДНК, а нижней – в состав другой. Мы говорим, что последовательности оснований в двух цепях комплементарны, так как последователь-

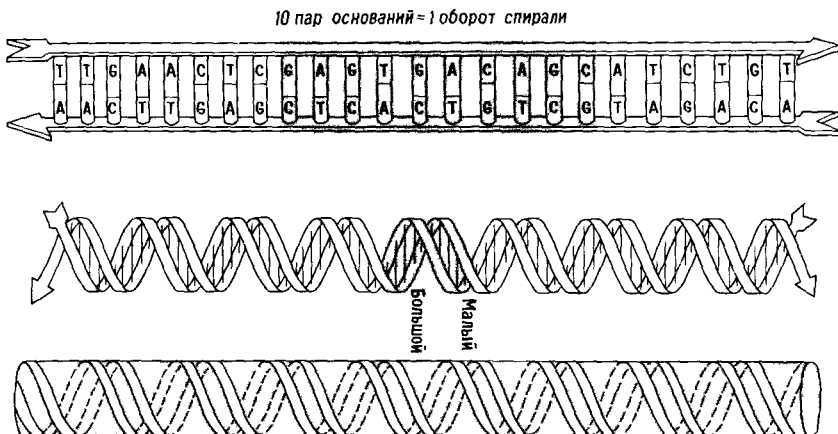


Рис. 2. Различные способы схематического изображения ДНК. На верхней схеме особое внимание обращается на спаривание комплементарных оснований. На средней схеме представлена общая форма двойной спирали с ее большим и малым желобками. Полярность цепей указана на этих двух схемах стрелками. Желобки видны также на нижней схеме, где ДНК изображена в виде протяженного цилиндра со спиральными полосами на поверхности. На самом деле на один оборот спирали приходится не 10, а 10,5 пары оснований.

ность одной из них определяется последовательностью другой согласно правилам спаривания оснований.

На второй схеме участок длиной около 80 пар оснований изображен в виде двойной спирали. Обратите внимание, что один оборот спирали состоит примерно из 10 пар оснований, так что эти 80 пар образуют примерно 8 витков. По поверхности спирали тянутся два желобка разной ширины, большой и малый. На схеме видно, что остовы цепей идут по поверхности спирали, а основания обращены внутрь.

Наконец, на третьей схеме ДНК изображена в виде цилиндра, по поверхности которого вьются остовы двух цепей спирали. Именно в такой форме, когда структурные особенности спирали показаны в упрощенном виде, но с соблюдением пропорций, мы будем изображать молекулу ДНК в первой главе.

Наличие стрелок у каждой из цепей на рисунке указывает на еще одно важное свойство двойной спирали ДНК: цепи имеют определенную направленность или полярность и идут в противоположных направлениях. Как показывает рис. 3, полярность цепей обусловлена тем, что химические связи, образующие остов каждой цепи, асимметричны. Стрелки направлены от 5'-концов цепей к 3'-концам (в подписи к рисунку объясняется такой выбор направления цепей).

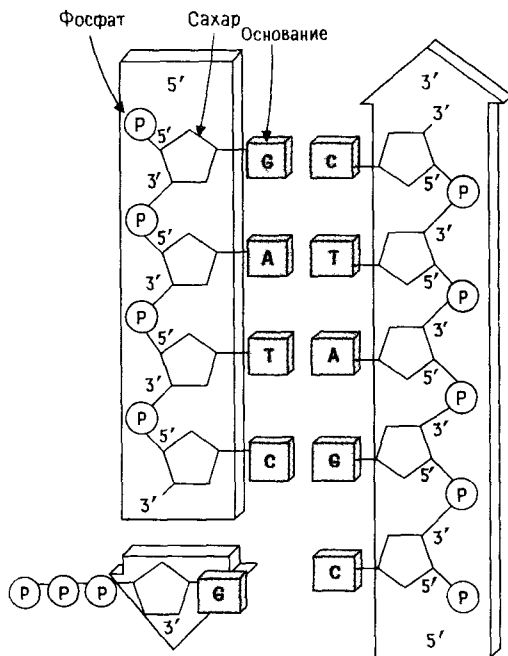


Рис. 3. Молекула ДНК, изображенная более крупным планом. Остов каждой цепи ДНК состоит из чередующихся остатков сахара и фосфата. Направление цепей определяется тем, как сахарный остаток связан с фосфатами: один из них присоединяется с помощью 5'-связи, а другой—3'-. Каждый сахарный остаток связан также с основанием, которое спарено с комплементарным основанием другой цепи. GC-пары оснований стабилизируются тремя водородными связями, а AT-пары—двумя. При наращивании цепи гуанин, соединенный с сахарофосфатной группировкой, присоединяется к одной из цепей, при этом две фосфатные группы отщепляются.

Принцип комплементарности последовательностей объясняет, каким образом происходят правильное удвоение генов и (как мы вскоре узнаем) их экспрессия. На рис. 4 показано, что при репликации ДНК ее цепи расплетаются и затем каждая из них копируется согласно правилам спаривания оснований. При этом каждая родительская цепь используется в качестве матрицы для образования комплементарной цепи и при делении клетки две дочерние клетки получают копии родительских генов.

Обычно ген состоит примерно из 1000 пар оснований (100 витков) и входит в состав гораздо более длинной молекулы ДНК. Первый этап экспрессии гена всегда одинаков: последовательность одной из цепей ДНК копируется, или транскрибируется, в виде линейной молекулы РНК. Как показано

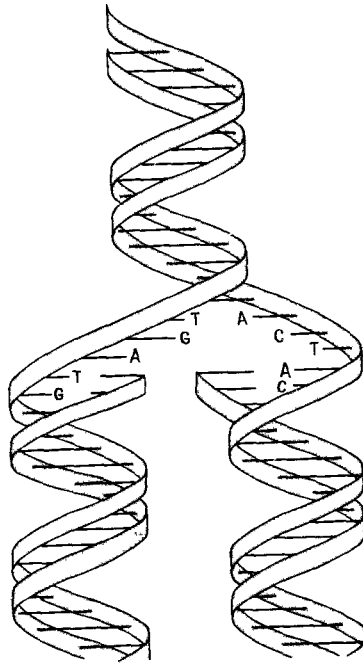


Рис. 4. Репликация ДНК. У верхней части молекулы цепи еще не разошлись и образуют как бы ствол. Отходящие от него ветви – разошедшиеся цепи – служат матрицами для образования комплементарных цепей. При копировании А спаривается с Т, а Г – с С.

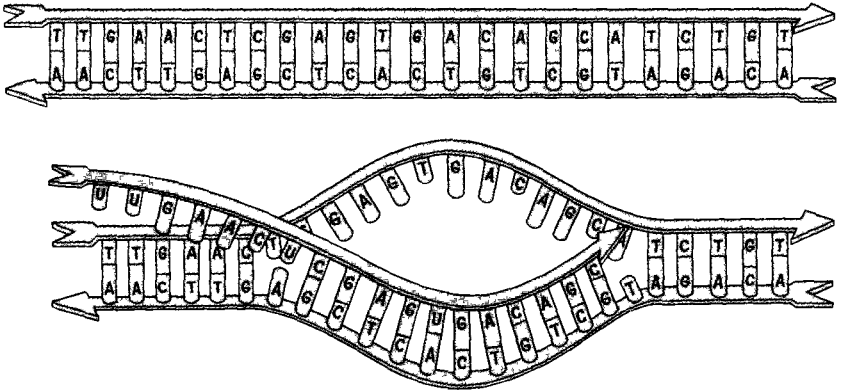


Рис. 5. Комплементарность мРНК и ДНК. Основание U в РНК соответствует основанию Т в ДНК. Последовательность изображенной на рисунке мРНК комплементарна последовательности нижней цепи ДНК. Эта мРНК, а также мРНК на двух следующих рисунках синтезируются в направлении слева направо.

на рис. 5, последовательность оснований РНК идентична последовательности одной из цепей ДНК и комплементарна последовательности другой (матричной) цепи. Мы будем считать, что ген *включен*, если он копируется с образованием РНК, и *выключен*, если нет.

Одни молекулы РНК являются конечными продуктами, которые сами по себе выполняют в клетке определенные функции. Другие РНК, называемые матричными или информационными (мРНК), направляют синтез других молекул — белков. Существует множество различных белков: это, например, структурные компоненты клетки, антитела, ферменты и т. д. Последние фактически выполняют всю работу в клетке, в том числе осуществляют транскрипцию и репликацию ДНК.

Белковая молекула представляет собой цепочку из звеньев, называемых аминокислотами; их последовательность определяется последовательностью оснований соответствующего гена. Считывание (трансляция) мРНК происходит последовательно, начиная с 5'-конца. Каждая следующая группа из трех оснований определяет, какая из 20 аминокислот должна быть присоединена к растущей белковой цепи. Первую аминокислоту белковой цепи называют N-концом (или амино-концом), последнюю — С-концом или (карбокси-концом).

Каждая белковая молекула складывается определенным образом, в зависимости от аминокислотной последовательности. При этом обычно образуется частица примерно сферической формы (глобула), на поверхности которой имеются характерные выступы и впадины. Во введении и в первой главе мы обсудим работу ряда белков, которые будут изображены

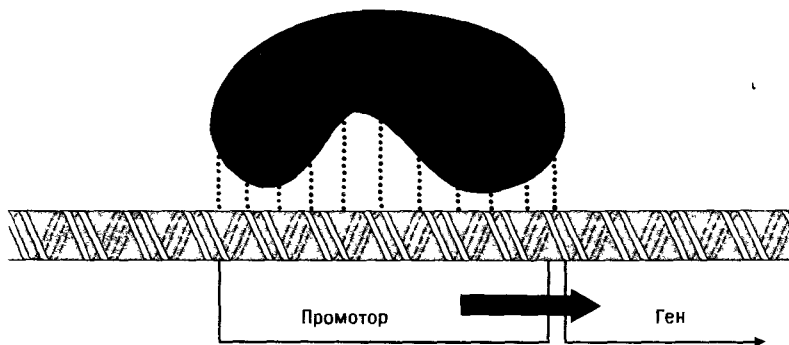


Рис 6. Промотор и РНК-полимераза. При связывании с промотором в начале гена РНК-полимераза покрывает 6 витков спирали, т. е. около 60 пар оснований. Упрощенное изображение РНК-полимеразы на рисунке не отражает того факта, что этот крупный фермент состоит из нескольких цепей с разными аминокислотными последовательностями. Стрелка указывает направление транскрипции, которая начинается с пары оснований, расположенной точно над левым концом стрелки.

в виде шариков и других округлых тел. Во второй главе мы рассмотрим роль характерных особенностей поверхности некоторых белков в их работе и регуляции активности генов.

Гены транскрибируются с образованием мРНК под действием фермента, который называется РНК-полимеразой. Процесс начинается со связывания фермента вблизи начала гена с так называемым промотором. Промотор имеет длину порядка 60 пар оснований. На рис. 6 изображена молекула РНК-полимеразы непосредственно перед связыванием с промотором типичного бактериального гена. О форме этого фермента нам мало что известно, но мы знаем его примерные размеры.

Связавшись с промотором, полимеразы начинают перемещаться вдоль гена, синтезируя мРНК (рис. 7). Обратите внимание, что по мере своего перемещения полимеразы расплетают и затем вновь заплетают последовательные короткие участки ДНК. В результате этого временного расплетания

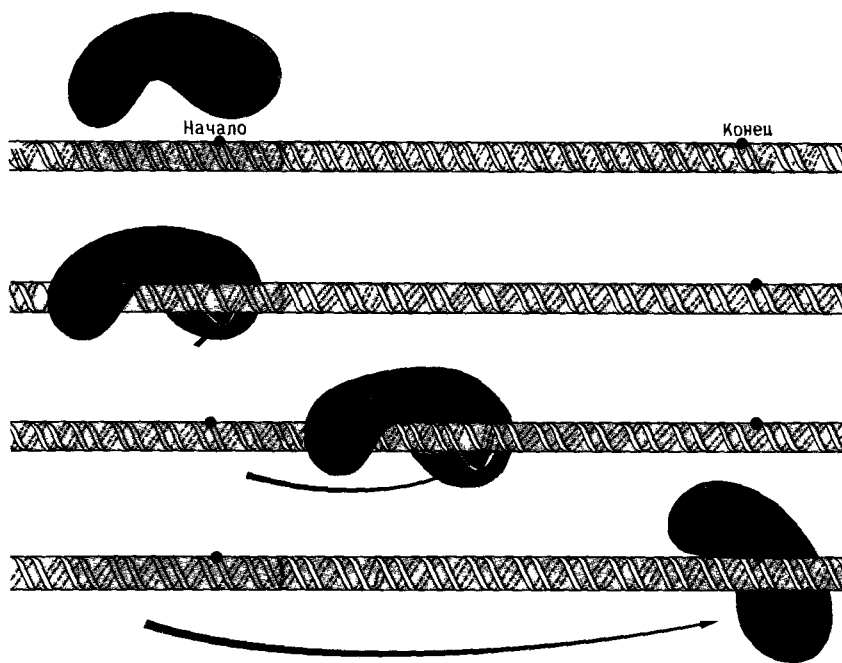


Рис. 7. Транскрипция гена. По мере движения полимеразы вдоль ДНК один и тот же ее участок постоянно контактирует с расплетенным участком ДНК длиной около одного оборота спирали. То основание матрицы, которое копируется в настоящий момент, находится в пределах расплетенного участка ДНК на расстоянии примерно 20 пар оснований от переднего края полимеразы. Когда полимеразы достигают стоп-сигнала, она отходит от ДНК и мРНК высвобождается.

пары оснований расходятся и последовательность одной из цепей служит матрицей для образования комплементарной мРНК.

Каждый промотор определяет, в каком направлении будет перемещаться полимеразы вдоль спирали ДНК, и при движении в заданном направлении фермент считывает только одну из цепей с образованием мРНК. Полярность цепи мРНК противоположна полярности матричной цепи ДНК.

Как показано на рис. 8, две молекулы полимеразы, движущиеся в противоположных направлениях, считывают разные цепи. Полимераза, движущаяся налево, считывает «верхнюю» цепь (обозначения цепей приведены на верхней схеме рис. 2). Когда мы будем подробнее обсуждать строение вируса λ , мы увидим, что его единственная молекула ДНК состоит из многих генов, причем одни из них считываются слева направо, а другие – справа налево.

Работе РНК-полимеразы, транскрибирующей тот или иной ген, способствуют или препятствуют «регуляторные» белки: они связываются с участками ДНК, называемыми операторами. Белок, осуществляющий негативную регуляцию, препятствует транскрипции, а позитивную – способствует ей (стимулирует ее). В первой главе мы расскажем о работе одного регуляторного белка, λ -репрессора, который является одновременно и позитивным, и негативным регулятором транскрипции.

Мы часто будем говорить, что тот или иной регуляторный белок связывается с определенным операторным участком (или участками) в молекуле ДНК. При этом имеется в виду, что белок обычно находится на этом участке, но легко может покинуть его (так оно часто и бывает). Произойдет ли немедленное связывание другой точно такой же молекулы с этим участком, зависит от концентрации данного белка и его сродства к этому участку ДНК.

Молекула ДНК может содержать более одного участка, способного связывать определенный белок. Такие участки могут различаться по силе связывания этого белка. При низкой концентрации белка в каждый данный момент времени более сильный участок с большей вероятностью будет связан с белком, чем более слабый. Однако при высокой концентрации белка, как показано на рис. 9, разница в сродстве уже не будет иметь значения и оба участка связывания обычно будут заняты. Это состояние динамического равновесия возникает потому, что связи, участвующие в ДНК-белковых взаимодействиях, гораздо слабее, чем, например, связи, которые удерживают вместе мономерные звенья белковой цепи.

Четыре главы нашей книги построены следующим образом. В первой главе описано, как регуляторные белки λ -репрессор и σ связываются с ДНК и взаимодействуют с

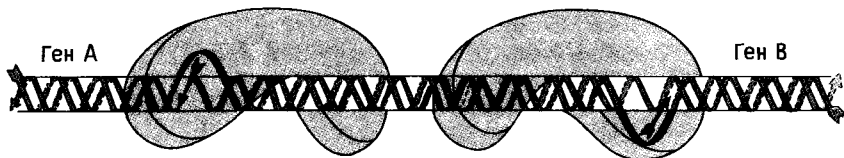


Рис. 8. Двухнаправленность процесса транскрипции. Последовательность мРНК гена В комплементарна одной из цепей ДНК, а мРНК гена А – другой.

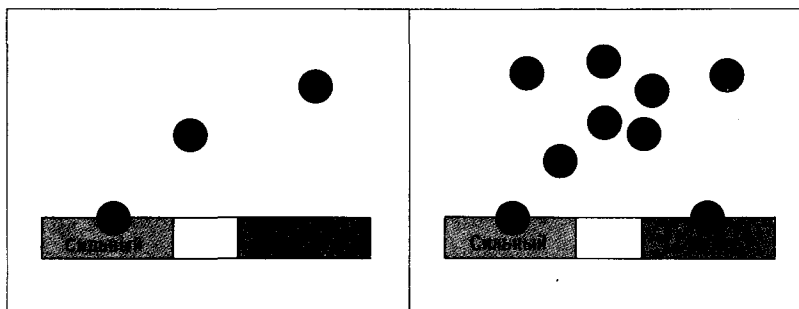


Рис. 9. Связывание регуляторного белка с сильным и слабым операторными участками. При низкой концентрации регуляторный белок занимает только сильный операторный участок, а при высокой – оба участка. Другими словами, с увеличением концентрации белок вначале связывается с сильным участком, а затем – со слабым.

РНК-полимеразой, определяя, какие промоторы будут использоваться для транскрипции. Эти компоненты образуют в совокупности генетический регуляторный механизм («переключатель генов»), который с поразительной эффективностью изменяет экспрессию генов после того, как бактерию, содержащую фаг λ в латентной форме, подвергают УФ-облучению.

Чтобы понять действие регуляторного механизма на этом уровне, мы должны иметь общее представление о молекулярной структуре его компонентов. При этом мы будем изображать ДНК в виде жесткой палочки, на которой имеются участки связывания РНК-полимеразы и регуляторных белков; эти белки показаны в виде шариков или гирек, они связываются с промоторами и операторами и включают и выключают гены. Чтобы действие регуляторного механизма было понятно, его компоненты и их взаимодействия изображены по отдельности на многих несложных рисунках.

В гл. 2 структура регуляторных белков рассмотрена гораздо подробнее. В ней описаны общие, сравнительно простые механизмы, используемые этими белками с некоторыми вариациями, чтобы распознать нужные последовательности ос-

нований среди миллионов других пар оснований. Показано, что структура регуляторного белка комплементарна определенной части структуры ДНК; если речь идет об узнавании нужной последовательности ДНК, две молекулы подходят друг другу, как ключ к замку. На этом уровне рассмотрения мы сможем представить, каким образом регуляторный белок включает и выключает ген.

В гл. 3 дана общая картина работы генов фага λ , когда фаг вызывает лизис клетки или, наоборот, переходит в латентную форму. Первые несколько стадий регуляции генов при заражении фагом одинаковы в обоих случаях. На критическом этапе один из фаговых регуляторных белков «улавливает», в каком состоянии находится хозяйская клетка, и определяет, как будут развиваться дальнейшие события. Этот этап «принятия решения» — показательный пример того, как условия окружающей среды влияют на регуляцию работы генов в ходе развития. Последовательность регуляторных событий каждого пути развития после принятия решения представляет собой каскадный механизм, когда ряд генов последовательно включается и выключается в соответствии с предопределенной программой.

В гл. 4 описаны в общих чертах эксперименты, на которых основаны представления, рассмотренные в гл. 1 и 2. Некоторые экспериментальные доказательства я представил в упрощенном виде и не стремился к полноте изложения. Тем не менее для читателя, не очень хорошо знакомого с экспериментальными методами молекулярной биологии, эта глава будет труднее других. Ее необязательно читать с начала до конца, достаточно внимательно ознакомиться с наиболее интересными для читателя местами. В конце главы обсуждены некоторые нерешенные проблемы.

Главная цель этой книги — дать общее представление о механизмах, регулирующих отдельные гены фага λ , и о том, как эти механизмы взаимодействуют друг с другом, образуя регуляторные системы. Мы считаем, что важнейший процесс развития организма из оплодотворенного яйца сводится к функционированию избирательно регулируемых генов. Поэтому в различных местах книги, в частности в конце гл. 3 и в приложениях, проведены некоторые параллели между процессами развития и регуляцией генов у фага λ и в клетках высших организмов.

Несколько слов о номенклатуре. Гены обозначаются курсивом, обычно, хотя и не всегда, строчными буквами (например, *cro*, *recA*, *lexA*, *N*, *Q*); соответствующие белки обозначаются прямым шрифтом, с прописной буквы (например, Cro, RecA, LexA, N, Q). Иногда по историческим причинам белок имеет особое обозначение (например, репрессор, кодируемый геном *cI*).

Основные компоненты регуляторного механизма

Гены фага λ составляют одну молекулу ДНК-хромосому, упакованную в белковую оболочку (рис. 1.1). Оболочка представляет собой сложную структуру, включающую головку и хвостовой отросток и состоящую примерно из 15 разных белков. Все эти белки кодируются хромосомой фага λ . Фаговая частица инфекционна: она присоединяется с помощью хвостового отростка к поверхности клетки *E.coli*, прокалывает ее стенку и вводит свою хромосому в бактерию, оставляя белковую оболочку снаружи. Фаг λ – облигатный паразит: чтобы размножиться, он должен ввести свою ДНК в бактерию.

Дальнейшие события в бактериальной клетке, зараженной фагом λ , могут развиваться двояким образом (рис. 1.2). Для одних клеток наблюдается литический путь развития: различные группы фаговых генов включаются и выключаются в соответствии со строго predetermined программой, хромосома λ интенсивно реплицируется, синтезируются новые белки головки и хвостового отростка, в бактериальной клетке образуются новые фаговые частицы, и примерно через 45 мин после заражения происходит лизис бактерии с высвобождением около 100 фаговых частиц.

В других клетках инъецированная фаговая хромосома лизогенизирует хозяйскую клетку: все фаговые гены, кроме одного, выключаются, и фаговая хромосома, которая теперь называется профагом, становится частью хозяйской хромосомы. По мере того как лизогенная бактерия, несущая профаг, растет и делится, профаг пассивно реплицируется и переходит в латентной форме в дочерние бактериальные клетки, все время оставаясь в составе хозяйской хромосомы. Этот процесс может повторяться бесконечно, и в отсутствие внешних возмущений такие растущие и делящиеся лизогенные бактерии очень редко продуцируют фаг.

Однако при УФ-облучении почти все лизогенные клетки в популяции лизируются и дадут новый урожай фага λ . Ультрафиолетовый свет включает или индуцирует молчавшие до сих пор фаговые гены, и начинается литический цикл. Литический цикл в лизогенных клетках индуцируют многие

другие воздействия, повреждающие хозяйскую ДНК, а не только УФ-свет. Чтобы «почувствовать» предстоящую гибель хозяйской клетки под действием индуцирующего воздействия, фаговая хромосома использует бактериальные ферменты. Она покидает многократно повторенный путь пассивной репликации и переходит на путь литического развития.

В данной главе объясняется, каким образом фаговые гены поддерживаются в молчащем состоянии при лизогении и как происходит их включение с высокой эффективностью при переходе на путь литического развития при действии индуцирующего сигнала на лизогенную клетку. В общих чертах переключение происходит следующим образом.

В лизогенной клетке работает единственный фаговый ген, кодирующий белок-репрессор фага λ . Репрессор является и позитивным, и негативным регулятором экспрессии генов. Связываясь всего с двумя операторами ДНК фага λ , он выключает все остальные фаговые гены и включает свой собственный ген. (В гл. 3 объяснено, как включается ген, кодирующий репрессор, в самом начале, сразу после заражения, когда никакого репрессора в клетке еще нет.)

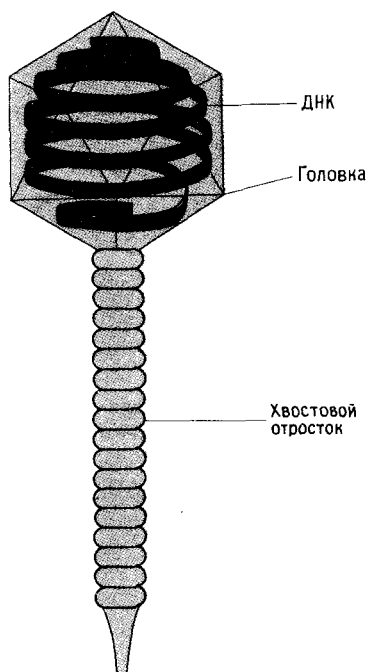


Рис. 1.1. Частица фага λ . Хромосома фага λ длиной около 50 000 пар оснований находится в головке фага, где она намотана на белковую сердцевину.

Хотя в лизогенной клетке имеется только один профаг, в ней содержится около 100 активных молекул репрессора и лишние молекулы репрессора могут связаться с любой добавочной хромосомой λ , проникшей в клетку. В результате фаг не может литически размножаться в лизогенных клетках (рис. 1.3). Говорят, что лизоген обладает иммунитетом по отношению к заражению λ .

Ультрафиолетовое облучение лизогенных клеток инактивирует репрессор. В результате синтезируется другой фаговый регуляторный белок — Cго. Cго начинает литический цикл и необходим для него. Он связывается с теми же операторными участками, что и репрессор, но оказывает противоположное физиологическое действие. Именно эти два регуляторных белка вместе с РНК-полимеразой и соответствующими промо-

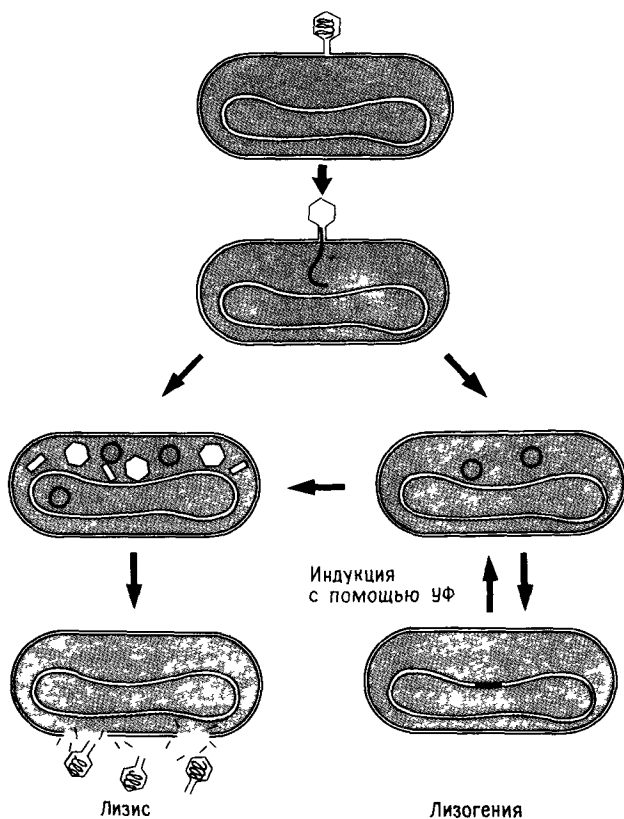


Рис. 1.2 Пути развития фага λ . Хромосома фага, введенная в клетку, вызывает либо лизис, либо лизогенизацию. Ультрафиолетовое облучение лизогена индуцирует литический процесс. Индукция лизогенов была впервые продемонстрирована в случае профага бактерии *Bacillus megaterium*.

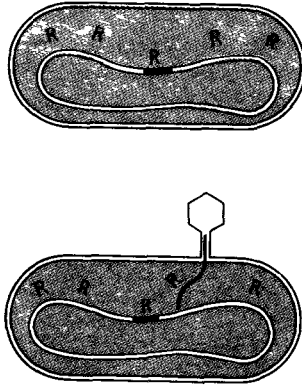


Рис. 1.3. Иммуниет λ -лизогена. Другие частицы фага λ могут ввести свою ДНК в клетку, лизогенную по фагу λ , но молекулы репрессора немедленно выключают гены таких «суперинфицирующих» хромосом точно так же, как они выключают гены профага. Таким образом, иммунитет обеспечивается тем же репрессором, который поддерживает латентное состояние профага.

торными и операторными участками ДНК) составляют аппарат переключения («переключатель генов»).

Несколько упрощая, можно сказать, что аппарат переключения может находиться в одном из двух состояний: в первом, соответствующем лизогении, ген репрессора включен, а ген, кодирующий C_{θ} , выключен; во втором, т.е. при литическом росте, ген cro включен, а ген репрессора выключен. Перейдем теперь к описанию приблизительной формы и размеров компонентов переключателя генов и их взаимодействий.

Компоненты переключателя

ДНК

Гены, кодирующие репрессор и C_{θ} , а именно cI и cro , соседствуют в хромосоме λ . Эти гены транскрибируются в противоположных направлениях (рис. 1.4). Точки начала транскрипции этих двух генов разделены участком в 80 пар оснований, и в этой области расположены участки двух типов, промоторы и операторы, с которыми могут связываться белковые компоненты переключателя.

Из рис. 1.4 видно, что каждый из генов cI и cro имеет свой собственный промотор. Промотор cI , который обозначают P_{RM} , направляет полимеразу налево, а промотор cro , P_R — направо. Участки молекулы ДНК, образующие эти промоторы, на рисунке выделены цветом. Обратите внимание, что эти два промотора соседствуют, но не перекрываются.

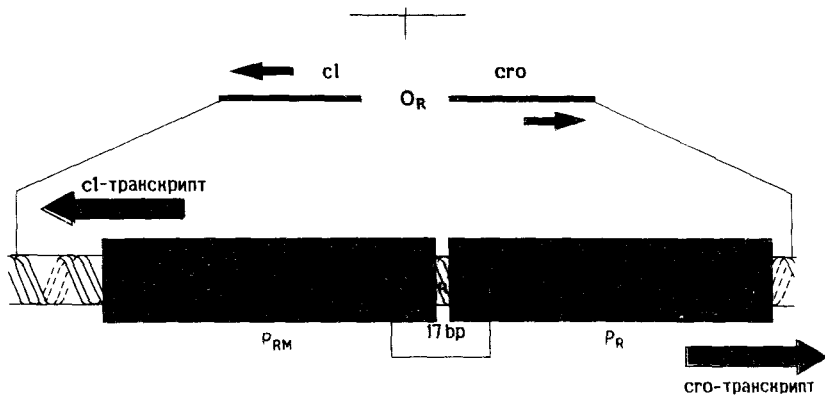


Рис 1.4 Небольшой участок молекулы ДНК фага λ . Два промотора, расположенные «спина к спине» (P_{RM} и P_R), запускают движение полимеразы в противоположные стороны: налево идет транскрипция гена репрессора cI , направо — гена cro . Правый оператор O_R состоит из трех частей и перекрывается с обоими промоторами. Каждый из трех участков, образующих оператор, называют операторным участком.

Три расположенных рядом участка, O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} , образуют O_R — правый оператор λ . Он также показан на рис. 1.4. Репрессор и Cro связываются с этими участками и регулируют активность обоих промоторов. Обратите внимание на расположение операторных участков: каждый из них перекрывается с одним из промоторов, а O_{R2} перекрывается с обоими промоторами.

Каждый операторный участок состоит из 17 пар оснований. Их последовательности сходны, но не идентичны, и регуляторные белки способны их различать. Например, какие бы два операторных участка мы ни взяли, один из них будет иметь большее сродство к Cro , чем другой. Это означает, что при определенной концентрации белка в каждый данный момент времени молекула Cro будет чаще обнаруживаться на одном участке связывания, чем на другом. При достаточно высоких концентрациях белка в каждый момент времени, как правило, будут заняты оба участка связывания.

Несколько слов об обозначениях. Лишь позднее, главным образом в гл. 3, станет ясно, какие соображения лежат в основе номенклатуры различных компонентов аппарата переключения. Вкратце правый промотор и оператор обозначаются P_R и O_R . Кроме того, имеются левые промотор и оператор, P_L и O_L , но они не участвуют в переключении. Обозначение гена cI отличает его от генов cII и $cIII$; обозначение « cro » происходит от первых букв английских слов *control of repressor and other genes* — регуляция гена репрессора и других генов,

поскольку именно в этом состоит функция данного гена. Буква М в обозначении P_{RM} происходит от английского слова maintenance (поддержание состояния репрессии) и отличает его от родственного промотора, который будет описан в гл. 3.

РНК-полимераза

РНК-полимераза – фермент, который транскрибирует фаговую ДНК с образованием РНК, – поставляется клеткой-хозяином. При связывании с P_R полимераза «настраивается» на транскрипцию гена *cro* (в правую сторону), а при связывании с P_{RM} – на транскрипцию гена *cI* (в левую сторону).

Рис. 1.5 иллюстрирует, какие положения занимали бы молекулы полимеразы, если бы они связались одновременно с двумя промоторами. В действительности эти два промотора в клетке никогда не бывают заняты одновременно: в зависимости от состояния аппарата переключения полимераза связывается лишь с одним из них. Итак, в присутствии репрессора полимераза может связаться с P_{RM} , но никогда не свяжется с P_R , а в присутствии Cro – наоборот. Один из ключевых вопросов, который ставится в настоящей главе: каким образом репрессор и Cro оказывают это противоположное действие?

Важное различие между промоторами P_R и P_{RM} состоит в том, что на первом из них РНК-полимераза связывается и начинает транскрипцию без всякого участия какого-либо регуляторного белка, осуществляющего позитивную регуляцию. Промотор P_{RM} , наоборот, эффективно используется полимеразой только при помощи белка-активатора; его роль выполняет репрессор.

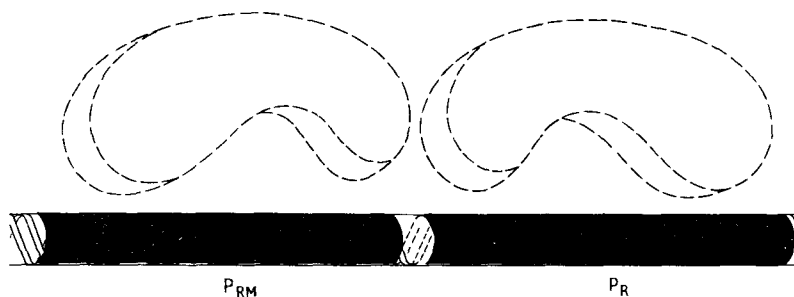


Рис. 1.5 Явление, которое на самом деле никогда не наблюдается. В принципе две молекулы РНК-полимеразы могли бы занять одновременно промоторы P_R и P_{RM} на одной и той же молекуле ДНК. Однако этого не происходит: в присутствии репрессора полимераза может занять P_{RM} , но не P_R , а в присутствии белка Cro она может занять P_R , но не P_{RM} .

Репрессор

Репрессор (он схематически изображен на рис. 1.6) – это белок из 236 аминокислот, который уложен в виде двух округлых, близких по размеру глобул – доменов. Домены соединены цепочкой из 40 аминокислот и называются амино- и карбокси-

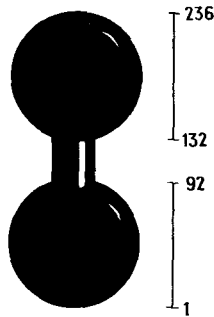


Рис. 1.6. Репрессор λ . Амино-концевой домен репрессора включает аминокислоты 1-92, а карбокси-концевой – остатки 132-236. Остальные 40 аминокислот связывают домены между собой.

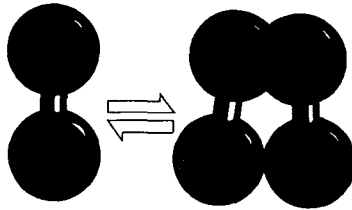


Рис. 1.7. Димеризация λ -репрессора. Мономеры репрессора ассоциируют с образованием димеров, которые в свою очередь могут диссоциировать на мономеры. В таких случаях говорят, что мономеры находятся в равновесии с димерами. Чем выше концентрация репрессора, тем большая часть его молекул находится в виде димеров.

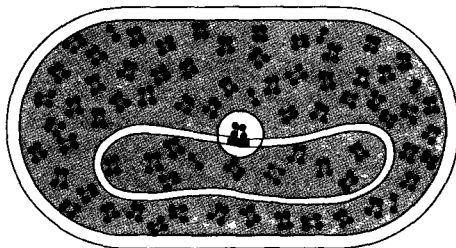


Рис. 1.8. Репрессор в лизогенной клетке. Большая часть репрессора в таких клетках находится в виде димеров. Единственная хромосома *E.coli* содержит один интегрированный профаг, с которым прочно связывается репрессор. Остальные димеры слабо ассоциированы с другими участками бактериальной хромосомы или находятся в клетке в свободном состоянии.

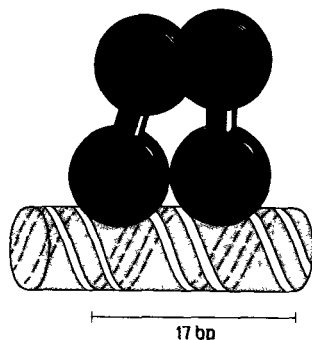


Рис 1.9 Димер репрессора связан с одним из операторных участков длиной 17 пар оснований. Каждый аминоконцевой домен располагается посередине определенного участка большого желобка (мы еще вернемся к этому в гл. 2)

концевыми доменами, так как первый из них содержит первую аминокислоту белковой цепочки, а второй – последнюю.

Две цепи, показанные на рис. 1.6 и называемые мономерами, ассоциируют с образованием димеров (рис. 1.7). Димер формируется главным образом за счет контактов между карбокси-концевыми доменами; аминоконцевые домены вносят лишь небольшой вклад в это взаимодействие. В лизогенной клетке примерно 95% молекул репрессора ассоциированы в димеры (рис. 1.8).

Димеры репрессора используют свои аминоконцевые домены для связывания с ДНК (рис. 1.9), причем каждый из трех участков, входящих в состав O_R , может связываться с одним димером репрессора. Димер репрессора связывается в каждом участке с одной стороной двойной спирали.

Белок Cto

Белок Cto (рис. 1.10) состоит всего из 66 аминокислот, образующих один домен. Сродство мономеров Cto друг к другу очень велико, и в клетке практически все молекулы Cto находятся в виде димеров. В отсутствие репрессора Cto может связываться с тремя операторными участками O_R . На рис. 1.11

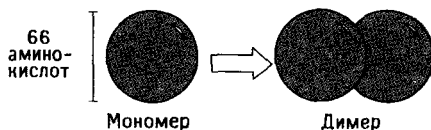


Рис 1.10 Белок Cto фага λ . Мономер Cto состоит всего из 66 аминокислотных остатков, но складывается в глобулярную структуру, размер которой близок к размеру аминоконцевого домена репрессора

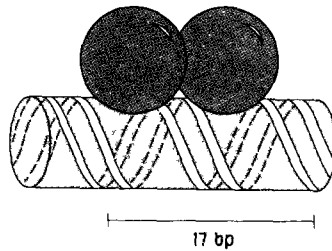


Рис. 1.11 Димер Сго-белка, связанный с операторным участком длиной 17 пар оснований. Сго-белок связывается на той же стороне двойной спирали, что и димер репрессора.

показано, что один димер Сго связывается с одной стороной двойной спирали каждого операторного участка и располагается при этом точно в том же месте, что и димер репрессора. Эти два белка, репрессор и Сго, связываются с одними и теми же операторными участками, но играют противоположные роли в механизме переключения.

Действие репрессора и Сго

Чтобы понять механизм действия репрессора, нужно прежде всего выяснить, к чему может привести связывание его с участком O_R2 при условии, что O_R1 и O_R3 остаются свободными. Такое связывание в норме никогда не наблюдается (почему это так, мы объясним ниже), однако его можно обеспечить экспериментально. Рис. 1.12 показывает, что репрессор, связавшийся с O_R2 , выполняет две функции, необходимые для

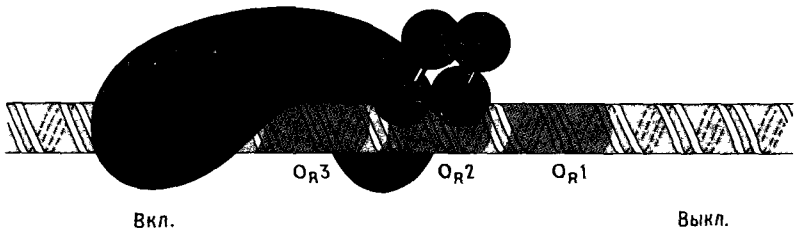


Рис. 1.12. Репрессор, связанный с O_R2 . В лизогенной клетке репрессор никогда не связывается с O_R2 , пока он не свяжется с O_R1 . Если же он все-таки свяжется с O_R2 , то включится промотор P_{RM} и выключится P_R , так что будет транскрибироваться только ген *cl*, но не ген *cro*. Подобно тому как белок-белковые взаимодействия удерживают вместе два мономера репрессора в составе димера, взаимодействие между аминоконцевым доменом репрессора и полимеразой помогает ферменту связаться с промотором P_{RM} и начать с него транскрипцию.

поддержания лизогенного состояния: он выключает ген *cro* и поддерживает включенным ген репрессора. Посмотрим теперь, какие механизмы лежат в основе этих функций.

Негативная регуляция

Репрессор, связанный с O_R2 , выключает ген *cro*, препятствуя связыванию РНК-полимеразы с P_R . Такой эффект обусловлен тем, что Cro закрывает участок ДНК, который должен быть доступен, чтобы полимеразы связались с P_R . Когда репрессор занимает O_R2 , РНК-полимераза не имеет доступа к той последовательности, которую ей необходимо опознать в промоторе. Этот принцип взаимно исключаящего связывания лежит в основе многих механизмов негативной регуляции.

Позитивная регуляция

Репрессор, присоединившись к O_R2 , *помогает* РНК-полимеразе связаться и начать транскрипцию с P_{RM} ; именно этот промотор обеспечивает транскрипцию *cI* в лизогенной клетке. Эффективность транскрипции увеличивается примерно в 10 раз. Репрессор получил свое название благодаря способности выключать все остальные фаговые гены. И лишь позднее стало ясно, что он является также позитивным регулятором, усиливая транскрипцию своего собственного гена.

Предполагаемый принцип действия репрессора в качестве позитивного регулятора иллюстрирует рис. 1.12; репрессор, находящийся на O_R2 , контактирует с РНК-полимеразой, связанной с P_{RM} . Димер репрессора, связанный с O_R2 , увеличивает сродство полимеразы к промотору, поскольку она удерживается здесь не только благодаря контактам с ДНК, но также за счет белок-белковых взаимодействий с репрессором.

В итоге димер репрессора, связанный с O_R2 , подавляет промотор P_R , исключая связывание с ним РНК-полимеразы, и способствует транскрипции с P_{RM} . Он подавляет транскрипцию, идущую влево. (Как будет показано в гл. 2, это различие объясняется тем, что O_R2 расположен несколько ближе к P_R , чем к P_{RM} .)

Рассмотрим теперь действие единственного димера репрессора, связанного с O_R1 или с O_R3 . Как видно из рис. 1.13, репрессор, связанный с O_R1 , блокирует присоединение полимеразы к P_R , но расположен слишком далеко, чтобы повлиять на полимеразу, связанную с P_{RM} . P_{RM} работает очень слабо и изображен на рисунке выключенным, поскольку репрессор не связан с O_R2 . Как показано на рис. 1.14, репрессор, сидящий на O_R3 , блокирует связывание полимеразы с P_{RM} и не оказывает никакого действия на P_R .

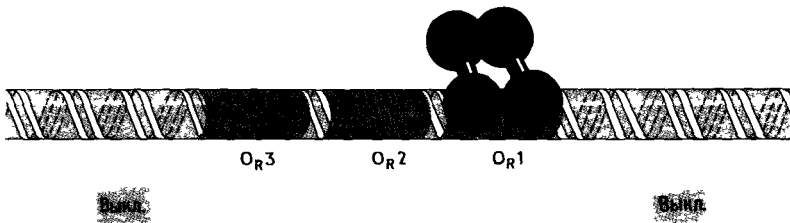


Рис. 1.13. Репрессор, связанный с O_{R1} . Когда репрессор присоединен только к O_{R1} , он блокирует связывание полимеразы с промотором P_R , но не препятствует ее связыванию с P_{RM} . Тем не менее P_{RM} также выключен, так как на участке O_{R2} нет молекулы репрессора, способствующего связыванию полимеразы.

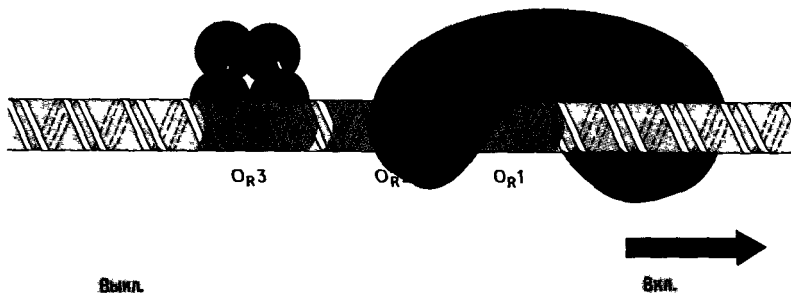


Рис. 1.14. Репрессор, связанный с O_{R3} . Если репрессор связан только с O_{R3} , он не оказывает никакого действия на промотор P_R , и этот промотор включен. P_{RM} при этом выключен.

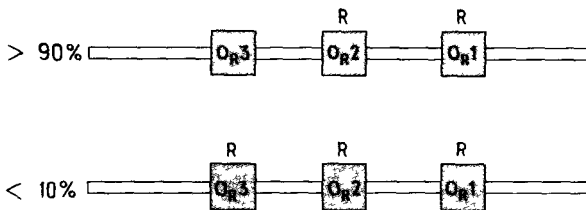


Рис. 1.15. Оператор λ в лизогенной клетке. Димеры репрессора связаны в первую очередь с участками O_{R1} и O_{R2} , а иногда также с O_{R3} .

Если сделать ряд моментальных снимков того, что происходит внутри лизогенной клетки, содержащей профаг λ , то мы увидим следующее (рис. 1.15). Димеры репрессора почти всегда связаны с O_{R1} и O_{R2} , а O_{R3} обычно свободен от репрессора. Такое расположение молекул репрессора на O_R приводит к выключению P_R и поддерживает P_{RM} во включенном состоянии; происходит синтез репрессора, но не белка Cro . Чем же определяется такое связывание репрессора при лизогении?

Кооперативное связывание репрессора

Связывание димеров репрессора с тремя операторными участками определяется двумя факторами. Первый из них – сродство димера к каждому из трех участков по отдельности, второй – взаимодействие между димерами репрессора, связанными с соседними участками. Подобно тому как репрессор, связанный с O_R2 , способствует связыванию полимеразы с промотором P_{RM} , репрессоры могут взаимодействовать друг с другом, облегчая связывание.

Представим себе димер репрессора, который приближается к свободному оператору. Хотя репрессор может попробовать связаться с каждым из трех участков, обычно он закрепляется на O_R1 , как это показано на рис. 1.16; другими словами, O_R1 обладает наибольшим сродством к репрессору из трех участков связывания. Этот акт связывания сразу же увеличивает сродство O_R2 ко второму димеру репрессора, так как второй димер контактирует не только с O_R2 , но и с уже связавшимся репрессором. Результат взаимодействия между репрессорами, находящимися на участках O_R1 и O_R2 , состоит в том, что эти два участка заполняются практически одновременно.

Рис. 1.16 показывает также, что при повышении концентрации репрессора заполняются не только O_R1 и O_R2 , но и O_R3 . Как было сказано выше, в результате связывания репрессора с O_R3 промотор P_{RM} выключается. Участок O_R3 связывает репрессор слабее, чем O_R2 , хотя собственное сродство этих двух участков к репрессору примерно одинаково и приблизительно в 10 раз ниже, чем участка O_R1 . Связывание репрессора с O_R2 облегчается благодаря взаимодействию с другой молекулой репрессора, сидящей на O_R1 , тогда как с O_R3 репрессор связывается независимо.

Почему репрессор, сидящий на O_R2 , помогает полимеразе связаться с P_{RM} , но не помогает другой молекуле репрессора связаться с O_R3 ? Ответ на этот вопрос дает рис. 1.16 и более подробно – рис. 1.17. Во взаимодействии соседних димеров репрессора друг с другом участвуют карбокси-концевые домены. Когда димер репрессора, сидящий на участке O_R2 , взаимодействует с другим димером на O_R1 , он уже не способен взаимодействовать с димером на O_R3 .

Мы предполагаем, что при взаимодействии димеры, связанные с O_R1 и O_R2 , наклоняются друг к другу. Это может происходить благодаря гибкости пептидного мостика, соединяющего аминок- и карбокси-концевые домены. Димер, связанный с O_R2 , изображен на рис. 1.16 наклоненным вправо; он контактирует с димером на O_R1 и не может одновременно контактировать с димером, сидящим на O_R3 . Поэтому участок O_R3 заполняется независимо. Однако репрессор на O_R1 способен взаимодействовать с полимеразой, связанной с P_{RM} , так

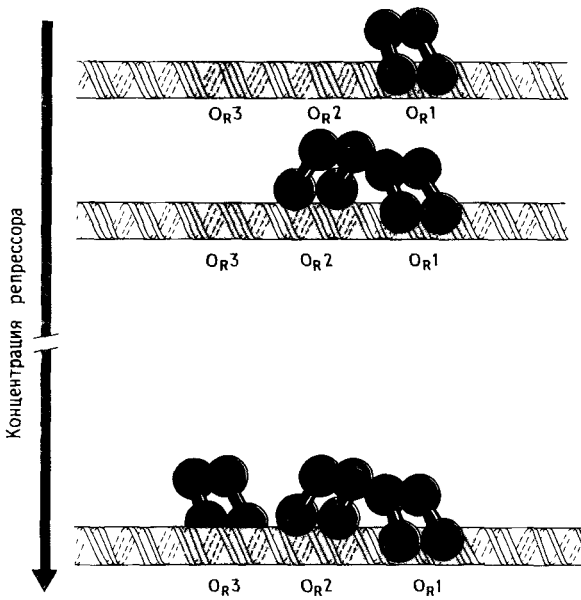


Рис. 1.16. Связывание репрессора с тремя участками O_R . Связь репрессора с O_{R1} примерно в 10 раз прочнее, чем с O_{R2} и O_{R3} , так что репрессор связывается предпочтительно с O_{R1} . Вторая молекула репрессора очень быстро связывается с O_{R2} , тогда как O_{R3} по-прежнему слабо связывает репрессор и заполняется только при более высокой его концентрации.

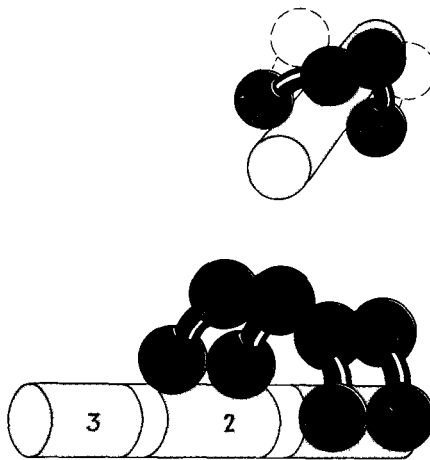


Рис. 1.17. Взаимодействие между соседними димерами репрессора. Мостик, связывающий аминоконцевой домен репрессора с карбокси-концевым доменом, достаточно гибкий, поэтому репрессор, находящийся на O_{R2} , может контактировать с репрессором на O_{R1} .

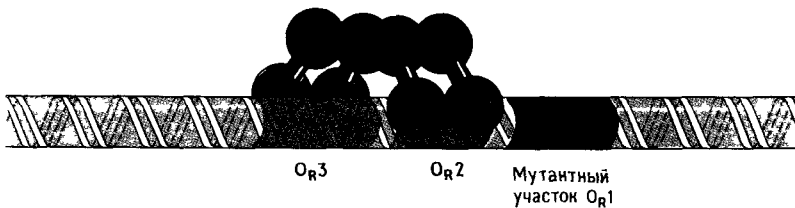


Рис 1.18 Взаимодействие между молекулами репрессора, связанными с участками O_{R2} и O_{R3} . Если O_{R1} несет мутацию, исключающую связывание с ним репрессора, то репрессор, находящийся на O_{R2} , может свободно взаимодействовать с другой молекулой репрессора, связанной с O_{R3} . Это взаимодействие увеличивает сродство репрессора к O_{R2} и O_{R3} примерно в 5 раз по сравнению с его сродством к этим участкам по отдельности.

как в этом контакте участвует аминоконцевой домен репрессора, который взаимодействует также с ДНК. Один из аминоконцевых доменов расположен именно так, что может контактировать с полимеразой.

Если мы правильно описали взаимодействие димеров репрессора на участках O_{R1} и O_{R2} , то можно предположить, что в отсутствие репрессора на участке O_{R1} репрессор на O_{R2} наклонится влево и будет взаимодействовать с молекулой репрессора на O_{R3} . Действительно, если участок O_{R1} изменен или делетирован, так что с ним не может связаться репрессор, то димеры на O_{R2} и O_{R3} взаимодействуют между собой. В этом случае димеры репрессора заполняют участки O_{R2} и O_{R3} одновременно, как показано на рис. 1.18.

Описанные нами белок-белковые взаимодействия представляют собой пример кооперативности. Так, молекулы репрессора кооперативно связываются с O_{R1} и O_{R2} . Поскольку димеры репрессора взаимодействуют друг с другом на O_{R1} и O_{R2} или на O_{R2} и O_{R3} , мы говорим об альтернативной попарной кооперативности участков связывания.

Индукция – переключение регуляторного аппарата

В лизогенных клетках репрессор, связанный с O_{R1} и O_{R2} , поддерживает ген *cro* в выключенном состоянии и в то же время стимулирует транскрипцию своего собственного гена *cI*, как это показано на рис. 1.19. По мере роста и деления клеток происходит постоянный синтез репрессора, тогда как ген *cro* остается выключенным. Если концентрация репрессора увеличивается (например, при временном подавлении деления клетки), то репрессор связывается также с O_{R3} и выключает собственный ген. Когда клетка снова начинает делиться и концентрация репрессора падает до определенного уровня, ген

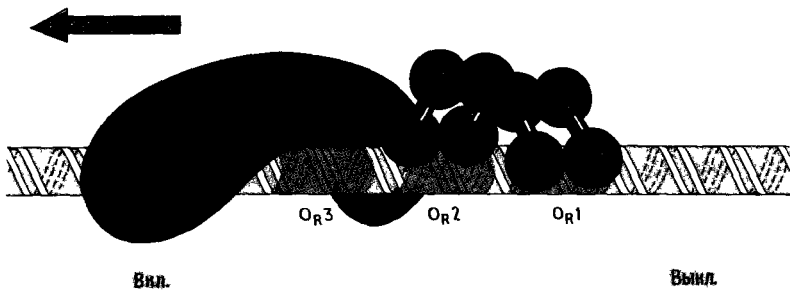


Рис 1 19 Репрессор и РНК-полимераза в лизогенной клетке Репрессор, связанный с O_{R1} и O_{R2} , стимулирует промотор P_{RM} и одновременно выключает P_R

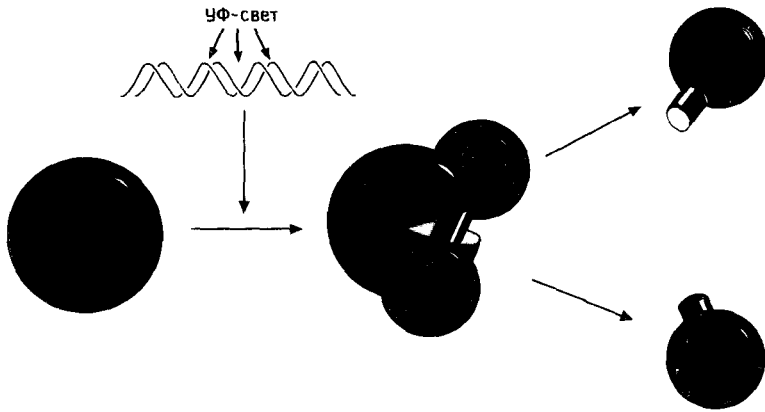


Рис 1 20 Расщепление репрессора белком Rec A. Оно происходит между аминокислотными остатками аланином и глицином в участке, связывающем домены репрессора друг с другом

cI вновь начинает работать, обеспечивая синтез репрессора. Так поддерживается постоянный уровень репрессора в клетке, не зависящий от колебаний скорости роста.

В клетке репрессор время от времени отделяется от оператора, но почти сразу же снова присоединяется к нему или его заменяет другая молекула репрессора, оказавшаяся неподалеку. Концентрация репрессора достаточно высока для того, чтобы в любой момент времени O_{R1} и O_{R2} с высокой вероятностью были заполнены. Таким образом, в отсутствие индуцирующего воздействия лизогенное состояние сохраняется почти бесконечно.

Теперь мы готовы к тому, чтобы понять, как УФ-облучение кардинальным образом изменяет поведение лизогенных кле-

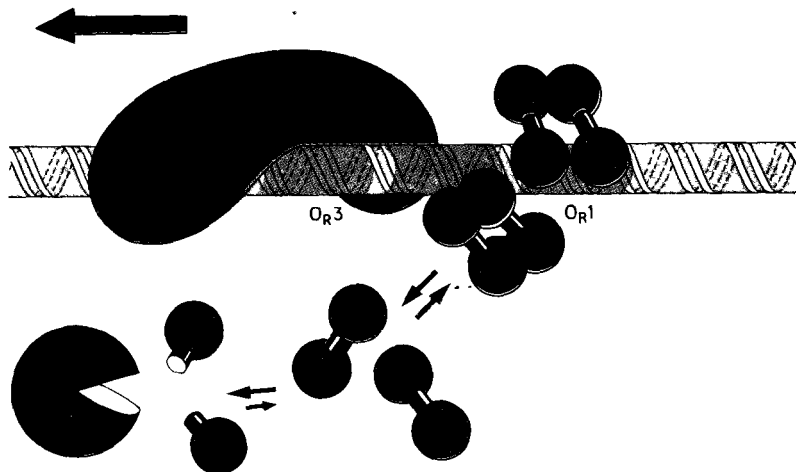


Рис 1.21. Расщепление репрессора и индукция. Расщепленные молекулы репрессора не могут образовывать димеры, поэтому в результате облучения они отсоединяются от оператора и не замещаются другими молекулами.

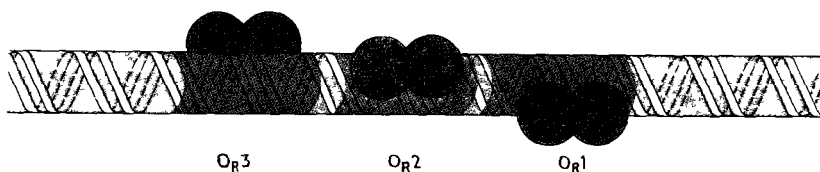


Рис 1.22. Связывание белка Cro с O_R . Димеры Cro независимо связываются с каждым из трех участков оператора.

ток. Начало этих драматических событий показано на рис. 1.20. Мишенью УФ-облучения и других индуцирующих воздействий является ДНК. Не совсем понятным образом повреждение в ней вызывает заметное изменение в поведении одного бактериального белка, который называется Res A.

В обычных условиях Res A катализирует рекомбинацию между молекулами ДНК, но если в ДНК появляются повреждения, этот белок становится также высокоспецифичной протеазой, которая расщепляет мономеры репрессора λ . (Res A расщепляет также другие репрессоры, включая таким образом гены, которые позволяют нелизогенным клеткам пережить УФ-облучение; без Res A такое облучение было бы летальным. Подробнее это явление описано в гл. 3.)

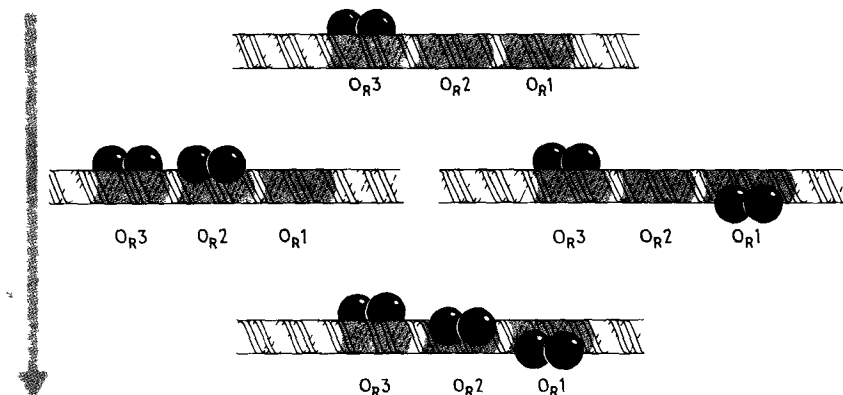


Рис 1 23 Порядок связывания димеров Cro с участками, составляющими O_R . Сродство Cro к участку O_{R3} примерно в 10 раз выше, чем к O_{R1} и O_{R2} . После того как первый димер Cro связался с O_{R3} , второй димер связывается с O_{R1} или O_{R2} . Белок Cro заполняет участки оператора в обратном порядке, чем репрессор. Таким образом, по сродству к белку Cro участки немутантного оператора O_R располагаются в следующем порядке $O_{R3} > O_{R1} = O_{R2}$, а по сродству к репрессору — $O_{R1} > O_{R2} = O_{R3}$.

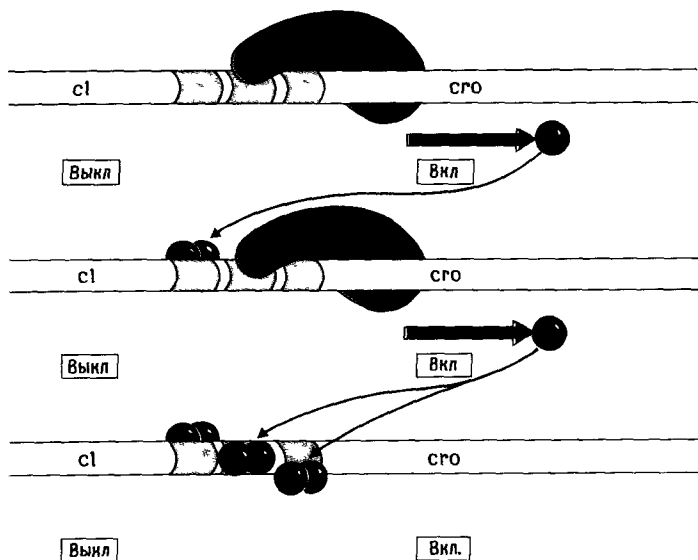


Рис 1 24 Действие белка Cro . Сначала Cro подавляет синтез репрессора с промотора P_{RM} , а затем включает свой собственный ген.

На рис. 1.20 показано, что расщепление происходит в определенном месте, расположенном в участке репрессора, соединяющем amino- и карбокси-концевой домены. Отделение карбокси-концевого домена от amino-концевого полностью инактивирует репрессор, так как изолированные amino-концевые домены не могут димеризоваться, а их сродство к оператору в мономерной форме слишком низко, чтобы обеспечить эффективное связывание при той концентрации, какая существует в лизогенных клетках. Теперь после отделения димера репрессора от оператора его нечем заменить (рис. 1.21).

Это ведет к двум последствиям. Во-первых, по мере того как репрессор освобождает O_R1 и O_R2 , скорость его синтеза падает (поскольку репрессор необходим для поддержания транскрипции своего собственного гена); во-вторых, полимераза связывается с P_R и начинает транскрипцию *cro*. Теперь именно белок Cro определяет ход событий.

Действие Cro проще, чем действие репрессора. Как показано на рис. 1.22, димеры Cro связываются независимо (не кооперативно) с тремя участками O_R . В отличие от репрессора Cro – белок со строго негативной регуляцией. Главная особенность функционирования Cro состоит в том, что три участка O_R по сродству к нему располагаются в обратном порядке по сравнению с таковым для репрессора. На рис. 1.23 показано, что первая синтезированная молекула Cro связывается с O_R3 . Это препятствует связыванию полимеразы с P_{RM} и подавляет дальнейший синтез репрессора. К этому моменту переключатель генов сработал и начался литический цикл.

Пока P_R продолжает работать и ген *cro* транскрибируется, транскрибируются также и гены, лежащие справа от *cro*, продукты которых необходимы на ранних стадиях литического цикла (гл. 3). Синтезируется все больше белка Cro, пока его концентрация не достигнет уровня, при котором заполняются также участки O_R1 и O_R2 и связывание полимеразы с P_R подавляется (рис. 1.24). Таким образом, белок Cro вначале выключает синтез репрессора, а несколько позже выключает (или снижает) экспрессию своего собственного гена и других ранних литических генов.

Кооперативность: устойчивость и чувствительность переключателя генов

Мы описали три вида кооперативности с участием белок-белковых взаимодействий, которые обеспечивают высокую эффективность механизма переключения.

● Во-первых, мономеры репрессора образуют димеры – ДНК-связывающую форму репрессора. Эти димеры свободно

диссоциируют на мономеры, и в клетке мономеры и димеры находятся в равновесии. Описывая связывание димера, можно сказать, что один мономер способствует связыванию другого с оператором, т.е. два мономера кооперативно связываются с одним операторным участком.

● Во-вторых, димеры кооперативно связываются с соседними участками оператора. Основное проявление этой кооперативности состоит в том, что димер репрессора, находящийся на O_R1 , способствует связыванию другого димера с O_R2 .

● В-третьих, репрессор на O_R2 помогает полимеразе связаться и начать транскрипцию с P_{RM} .

Общий результат этих проявлений кооперативности наглядно иллюстрирует рис. 1.25, на котором приведены кривые зависимости активности P_R от концентрации репрессора. Обратите внимание, что при лизогении синтезируется достаточное количество репрессора, чтобы уменьшить эффективность промотора P_R примерно в 1000 раз. При падении концентрации репрессора в 2–3 раза по сравнению с этим максимальным уровнем активность P_R не изменяется. В результате состояние репрессии оказывается защищенным от обычных колебаний концентрации репрессора, так что «случайная» индукция лизо-

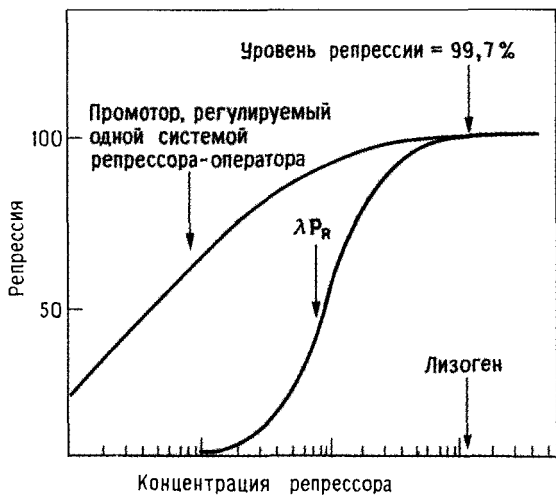


Рис. 1.25. Зависимость репрессии от концентрации репрессора в двух системах. Черная кривая показывает, что состояние репрессии в лизогенной клетке поддерживается только до тех пор, пока концентрация репрессора не упадет примерно в 5 раз. Даже небольшое дальнейшее снижение концентрации репрессора вызывает резкое изменение в работе системы, и происходит индукция. Взаимодействию репрессора с оператором, состоящим лишь из одного участка, отвечает цветная кривая. Видно, что такая система гораздо медленнее реагировала бы на изменение концентрации репрессора.

генных клеток происходит редко. Но если концентрация репрессора падает в 5 раз, происходит резкое изменение активности P_R , достигающей 50% от его полностью дерепрессированного состояния. В результате синтезируется достаточно белка Cro , чтобы произошло переключение генетической программы.

Весьма показательно рассмотреть гипотетический переключатель генов, лишенный кооперативности. Например, если бы O_R содержал лишь один участок связывания, O_{R2} , то система могла бы работать, но регуляция была бы грубой. Ведь если этот участок связывал бы димер репрессора настолько прочно, чтобы обеспечить 1000-кратную репрессию при лизогении, то индукция происходила бы с низкой эффективностью. Для запуска литического цикла пришлось бы инактивировать более 99% молекул репрессора, а это очень трудно осуществить.

Таким образом, свойства λ -репрессора дают ответ на вопрос, интересующий исследователей в области биологии развития: каким образом сравнительно небольшое изменение концентрации регуляторного белка способно надежно переключать экспрессию генов? Кооперативность во взаимодействии мономеров репрессора, т.е. связывание димера с каждым участком, а также кооперативное взаимодействие между димерами на ДНК многократно усиливают действие уменьшения концентрации мономеров репрессора. Кроме того, тот факт, что репрессор стимулирует транскрипцию своего собственного гена, осуществляя позитивную регуляцию, означает, что при падении концентрации репрессора эффективность синтеза его новых молекул также понизится. После того как концентрация репрессора упадет до критического уровня, первые молекулы новообразованного белка Cro окончательно подавят синтез репрессора и начнется литический цикл.

Две кривые на рис. 1.25, одна из которых описывает реальную кооперативную систему с участием λ -репрессора, а другая – некооперативную систему с одним участком связывания, напоминая кривые, описывающие поведение молекул – переносчиков кислорода – гемоглобина и миоглобина. Гемоглобин переносит кислород от легких к тканям, а миоглобин способствует переносу кислорода в мышечной ткани. Парциальное давление кислорода в тканях всего примерно в 5 раз ниже, чем в легких; тем не менее гемоглобин эффективно связывает кислород в легких и высвобождает его в тканях. Кривая зависимости связывания кислорода с гемоглобином от давления кислорода напоминает черную кривую на рис. 1.25, отвечающую высокой кооперативности. Четыре субъединицы гемоглобина, каждая из которых связывает одну молекулу кислорода, работают кооперативно, и поэтому связывание весьма чувствительно к концентрации кислорода. Связывание

кислорода с миоглобином описывается некооперативной кривой, похожей на красную кривую на рис. 1.25. Каждая молекула миоглобина связывает только одну молекулу кислорода, и такое связывание гораздо менее чувствительно к концентрации кислорода.

Действие авторегуляции

Мы уже отмечали, что помимо активации транскрипции своего собственного гена при лизогении (благодаря связыванию с O_{R1} и O_{R2}) репрессор использует O_{R3} , чтобы ограничивать свою собственную концентрацию. Благодаря такому взаимодействию с O_{R3} концентрация репрессора никогда не превышает уровня, при котором профаг может эффективно отвечать на индуцирующее воздействие. Избыток репрессора привел бы к подавлению индукции двумя путями.

● Во-первых, *Rec A* расщепляет мономеры репрессора довольно медленно; если бы концентрация репрессора оказалась слишком высокой, белок *Rec A* не мог бы расщепить достаточное число молекул, чтобы вызвать индукцию.

● Во-вторых, даже если бы такое расщепление произошло, состояние репрессии сохранилось бы. Объясняется это тем, что, хотя расщепленные мономеры репрессора не могут образовывать димеры, отщепленные аминоконцевые домены сохраняют способность некооперативно связываться с оператором. При достаточно высоких концентрациях эти аминоконцевые домены заполняют все три участка связывания независимо от того, входят они в состав димеров репрессора или нет.

Негативные и позитивные саморегулирующиеся системы, примерами которых являются два способа саморегуляции концентрации репрессора, совершенно по-разному отвечают на возмущения. Негативная регуляция способствует стабильности, т.е. поддержанию гомеостаза, тогда как позитивная ведет к неустойчивости. Если бы действовала только негативная регуляция, то при повышении или понижении концентрации репрессора скорость его синтеза соответственно уменьшалась бы или увеличивалась и концентрация возвращалась бы к равновесному уровню. Позитивная регуляция, наоборот, усиливала бы любое изменение концентрации репрессора: при ее увеличении она повышала бы скорость синтеза репрессора, а при падении – снижала.

На самом деле концентрация репрессора в лизогенных клетках достаточна, чтобы стимулировать P_{RM} почти до максимального уровня. В обычных условиях O_{R3} занят репрессором не более 10% времени. Таким образом, негативная саморегуляция включается лишь время от времени, чтобы компенсировать кратковременное увеличение концентрации репрессора.

Другие фаги

Известен ряд других фагов, способных не только к литической инфекции, но и к индуцибельной лизогении. Похожи ли при этом их механизмы переключения на механизм в случае фага λ ? Обратимся к двум фагам 434, который растет на *Escherichia coli*, и P22, который растет на *Salmonella typhimurium*. Лизогены 434 и P22, подобно лизогенам λ , эффективно индуцируются ультрафиолетовым светом. Оба фага кодируют репрессор и белок Cro, которые взаимодействуют с областью ДНК, аналогичной O_R фага λ .

Несмотря на некоторые различия в деталях, следующие положения справедливы для всех трех фагов. Правый оператор содержит три участка связывания репрессора, два из которых, O_{R1} и O_{R2} , заняты репрессором в состоянии лизогении. В этом состоянии играют важную роль кооперативные взаимодействия между соседними димерами репрессора. Мономеры репрессоров состоят из двух структурных доменов и находятся в равновесии с димерами, которые связываются с ДНК. Димеры репрессора, занимающие участки O_{R1} и O_{R2} , выключают транскрипцию с P_R и включают транскрипцию с P_{RM} . При индукции УФ-облучением репрессор расщепляется и тем самым инактивируется, после этого первым синтезируется белок Cro с промотора P_R . Cro прежде всего связывается с O_{R3} , чтобы выключить синтез репрессора, а затем — с O_{R1} и O_{R2} , чтобы снизить уровень транскрипции ранних генов литического цикла. Тот факт, что все эти явления широко распространены, свидетельствует об их исключительной роли в механизме переключения.

Литература: обзоры

- 1 Gussin G, Johnson A, Pabo C, Sauer R. Repressor and Cro protein structure, function, and role in lysogenization. In: Lambda II, R M Hendrix, J W Roberts, F W Stahl, and R Weisberg, eds., New York, Cold Spring Harbor, pp 93–123, 1983.
- 2 Johnson A D, Potete A R, Lauer G, Sauer R T, Ackers G K, and Ptashne M. λ repressor and cro components of an efficient molecular switch, Nature, **294**, 217–223 (1981).
- 3 Lwoff A. Lysogeny, Bacteriol Rev **17**, 269 (1953).
- 4 Ptashne M. Repressors, Trends in Biochemical Sciences **9**, 142–145 (1984).
- 5 Ptashne M, Backman K, Humayun M Z, Jeffrey A, Maurer R, Meyer B, Sauer R T. Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage λ . Science, **194**, 156–161 (1976).
- 6 Ptashne M, Gilbert W. Genetic repressors. Sci Amer, **222**, 36–44 (1970).
- 7 Ptashne M, Jeffrey A, Johnson A D, Maurer R, Meyer B J, Pabo C O, Roberts T M, Sauer R T. How the λ repressor and Cro work, Cell, **19**, 1–11 (1980).
- 8 Roberts J, Devoret R. Lysogenic induction. In: Lambda II, R W Hendrix, J W Roberts, F W Stahl and R Weisberg eds. New York, Cold Spring Harbor, pp 123–145, 1983.

Глава 2

ДНК-белковые взаимодействия и регуляция активности генов

Регуляторные белки, например репрессор λ и Cro , прочно связываются со специфическими последовательностями ДНК длиной 15–20 пар оснований. Каждый из этих белков должен выбрать свой операторный участок из примерно 5 млн. пар оснований, которые составляют бактериальную ДНК. В данной главе рассмотрены особенности структуры белков, которые ответственны за эту их способность. Принцип действия прост: структура белка комплементарна структуре ДНК; если белок находит нужную молекулу ДНК, молекулы белка и ДНК подходят друг другу, как ключ к замку. Кроме того, мы покажем, каким образом связавшийся регуляторный белок может влиять на экспрессию гена путем негативной или позитивной регуляции.

Оператор

Рис. 2.1 иллюстрирует, как в принципе можно опознать нужную последовательность в двухцепочечной ДНК. Атомы, лежащие вдоль краев пар оснований, «смотрят» в большой и малый желобки, которые тянутся вдоль спирали. Каждой паре оснований (A:T, T:A, G:C, C:G) соответствует свой набор химических групп, который может узнавать белок. Это не те группы, которые участвуют в комплементарном спаривании оснований; последние становятся доступными только при расхождении цепей, имеющем место, например, при репликации или на короткое время при транскрипции. Мы увидим, что λ -репрессор и Cro имеют выступы, которые встраиваются в большой желобок и «читают» последовательность оснований ДНК.

Все операторные участки, которые узнают репрессор, почти (хотя и не полностью) симметричны. Это становится понятно при рассмотрении полностью симметричной последовательности на рис. 2.2. Если изображенный участок ДНК повернуть на 180° в плоскости страницы вокруг точки, которой отмечена середина последовательности, получится совершенно такая же молекула. Отличительное свойство данного участка двухце-

почечной ДНК состоит в том, что его последовательность после поворота остается прежней.

Симметрию последовательности, изображенной на рис. 2.2, можно описать иначе. Представим себе крошечного демона, который находится в середине молекулы, в месте, обозначенном точкой. Посмотрев налево и направо, демон увидит совершенно одинаковые «коридоры» химических групп. В этом случае мы говорим, что последовательность обладает осью симметрии второго порядка. Если же заменить одну пару оснований, то последовательность будет не полностью симметричной.

Последовательности, которые узнают репрессор λ и белок Cro, приведены в табл. 2.1. Три из этих участков длиной 17 пар оснований происходят из правого оператора λ , O_R , а три — из левого оператора, O_L . Последовательности этих шести

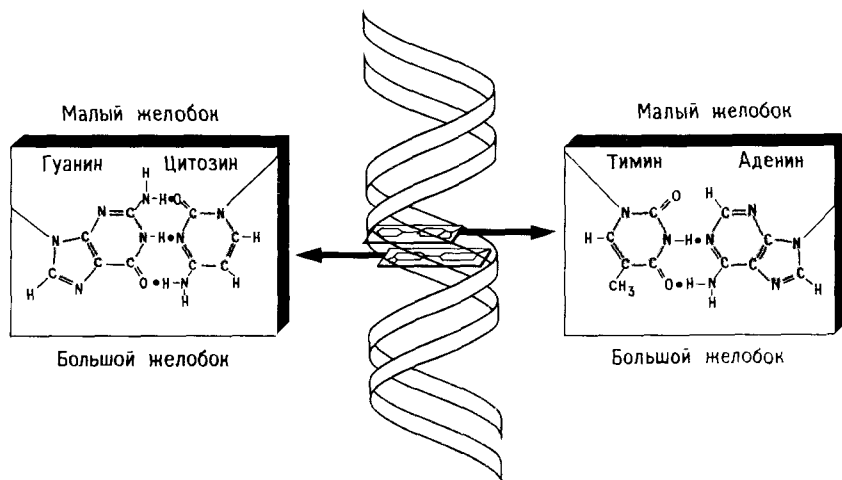


Рис. 2.1. Небольшой участок молекулы ДНК. При внимательном рассмотрении большого и малого желобков можно видеть, что для каждой пары оснований характерно особое расположение химических групп, выступающих в желобки по краям этой пары. Чтобы распознать последовательность ДНК, не обязательно расплетать молекулу.

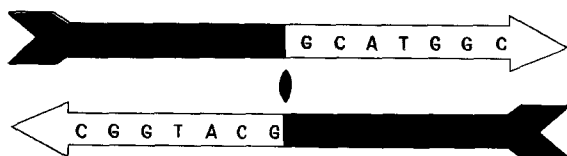


Рис. 2.2. Симметричная последовательность ДНК. Последовательность верхней цепи, прочитанная слева направо, совпадает с последовательностью нижней цепи, прочитанной справа налево. Черный значок — ось симметрии.

Таблица 2.1. Шесть операторных участков, которые узнают λ -репрессор и белок

O_1	T A T C A C C G C C A G T G G T A A T A G T G G C G G T C A C C A T
O_{R1}	T A T C A C C G C C A G A G G T A A T A G T G G C G G T C T C C A T
O_2	T A T C T C T G G C G G T G T T G A T A G A G A C C G C C A C A A C
O_3	T A T C A C C G C A G A T G G T T A T A G T G G C G T C T A C C A A
O_{R2}	T A A C A C C G T G C G T G T T G A T T G T G G C A C G C A C A A C
O_{R3}	T A T C A C C G C A A G G G A T A A T A G T G G C G T T C C C T A T

Участки связывания расположены в порядке увеличения сходства к димеру λ -репрессора. Центральная пара оснований, через которую проходит ось симметрии, отмечена цветом.

участков несколько различаются, и все они имеют разное сродство к репрессору и Cro.

Ни один из операторных участков λ не обладает идеальной симметрией, и если бы мы знали последовательность только одного из них, например $O_R 2$, симметрия вообще не бросилась бы в глаза. Но если разделить каждый операторный участок на две половины, а затем совместить их, как это сделано в табл. 2.2, вырисовывается совершенно отчетливая картина. В таблице указано, с какой частотой каждое из оснований встречается в каждом положении. Консенсус-последовательность¹⁾ половины участка связывания, записанная в двухцепочечном виде, имеет вид

TATCACCGC
ATAGTGCC

Каждый операторный участок более или менее сходен со следующей симметричной последовательностью, которая содержит две консенсус-половины и имеет ось симметрии, про-

¹⁾ Консенсус-последовательности получают, помещая в каждой позиции буквы, наиболее часто встречающиеся в этом месте.—Прим. ред.

Таблица 2 2 12 половин участков связывания λ-операторов

Операторный участок	1	2	3	4	5	6	7	8	9
O _{L1}	T	A	T	C	A	C	C	G	C
	T	A	C	C	A	C	T	G	
O _{R1}	T	A	T	C	A	C	C	G	C
	T	A	C	C	T	C	T	G	
O _{L2}	T	A	T	C	T	C	T	G	
	C	A	A	C	A	C	C	G	C
O _{L3}	T	A	T	C	A	C	C	G	C
	A	A	C	C	A	T	C	T	
O _{R2}	T	A	A	C	A	C	C	G	T
	C	A	A	C	A	C	G	C	
O _{R3}	T	A	T	C	A	C	C	G	C
	T	A	T	C	C	C	T	T	
Консенсус-последовательность	T ₉	A ₁₂	T ₆	C ₁₂	A ₉	C ₁₁	C	G ₉	C ₅
	C ₂	C ₃	T ₂	T ₁	T ₄	T ₂	T ₁		
	A ₁	A ₃	C ₁	G ₁	C ₁				

Все шесть полных участков, приведенных в табл 2 1, представлены здесь в виде двух половин. Записана только одна цепь каждой половины. Первая строчка в настоящей таблице соответствует верхней цепи левой половины участка в табл 2 1, прочитанной слева направо, вторая строчка нижней цепи правой половины участка в табл 2 1, прочитанной справа налево. Положения оснований в операторе пронумерованы. В нижней части таблицы указано, сколько раз каждое основание встречается в данном положении. В положение 9 половины участка можно в каждом случае поставить одно из двух оснований

ходящую через центральную пару оснований (выделена цветом):

TATCACCGCCGGTGATA
ATAGTGGCGGCCAТAT

Последовательность оснований каждого операторного участка должна иметь характерный «рисунок» расположения функциональных групп, который узнают репрессор и Cro. Кроме того, эти белки должны различать операторные участки, чтобы обеспечить нужный порядок связывания в зависимости от сродства, как описано в гл. 1. Ниже мы рассмотрим структуры репрессора и Cro, которые узнают эти последовательности.

Репрессор

Во введении мы уже отмечали, что белковые молекулы складываются определенным образом в зависимости от их аминокислотной последовательности. Хотя цепочки с разной аминокислотной последовательностью обычно принимают разную форму, некоторые простые способы укладки повторяются во многих белках. Один из таких общих способов укладки белков — α -спираль.

Как показано на рис. 2.3, α -спираль образуется при закручивании цепочки аминокислот. Важное различие между α -спиралью и двойной спиралью ДНК состоит в том, что в

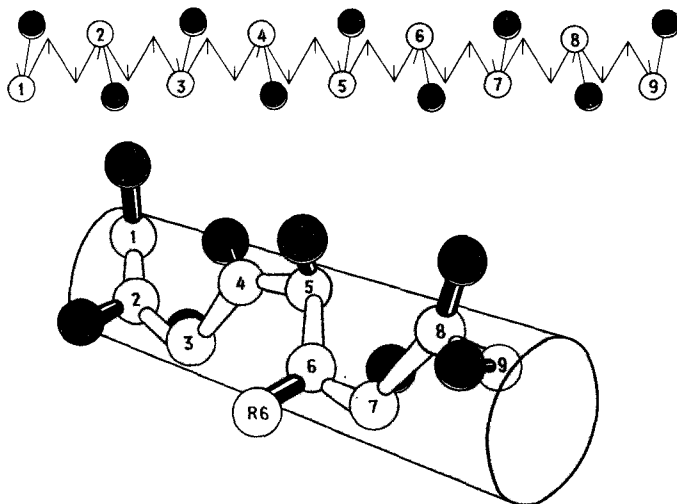


Рис. 2.3. Цепь аминокислот в развернутом виде и в виде α -спирали. Боковые цепи R1, R2 и т. д. различаются для всех 20 аминокислот. В α -спирали эти боковые цепи выступают из остова, который изображен на рисунке в виде цилиндра. Один виток спирали состоит из 3,6 аминокислотных остатков.

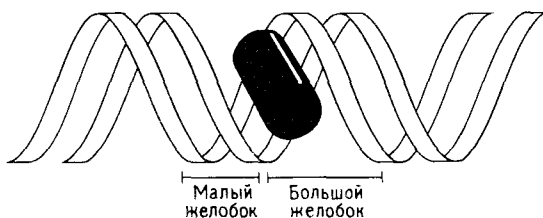


Рис. 2.4. α -Спираль, располагающаяся в большом желобке молекулы ДНК. Боковые цепи, выступающие из α -спирали (они здесь не показаны), доходят до краев большого желобка.

белке остов молекулы расположен внутри структуры, а характерные для каждого аминокислотного остатка группы, боковые цепи, выступают наружу.

На рис. 2.4 показано, насколько хорошо α -спираль соответствует большому желобку ДНК. Функциональные группы на поверхности α -спирали располагаются таким образом, чтобы иметь возможность взаимодействовать (контактировать) с химическими группами пар оснований ДНК, выступающими в желобок.

Чтобы понять, как λ -репрессор использует α -спираль для узнавания оператора, мы должны рассмотреть структуру репрессора более подробно, представив ее не в виде гантели, как это было сделано в гл. 1, а иначе. В соответствии с рис. 2.5 аминоконцевой домен репрессора складывается в пять последовательных α -спиральных участков (детальная структура остальной части молекулы неизвестна). α -Спираль 3 лежит на поверхности молекулы, это и есть «узнающая» спираль репрессора.

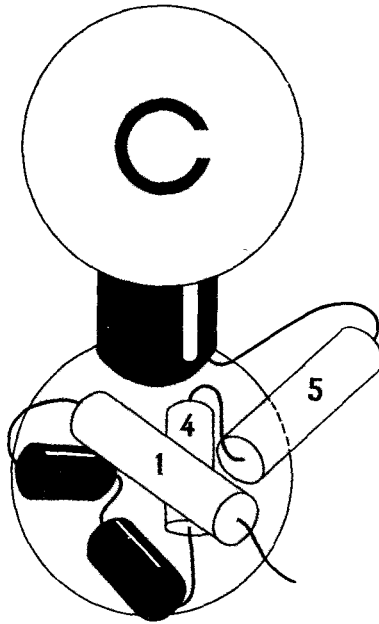


Рис. 2.5 Репрессор фага λ . Пять α -спиралей, которые входят в состав аминоконцевого домена репрессора, соединяются между собой аминокислотными цепочками. Спираль 1 расположена в непосредственной близости от аминоконца белковой молекулы. Структура сегментов, соединяющих α -спирали, и карбокси-концевого домена неизвестна.

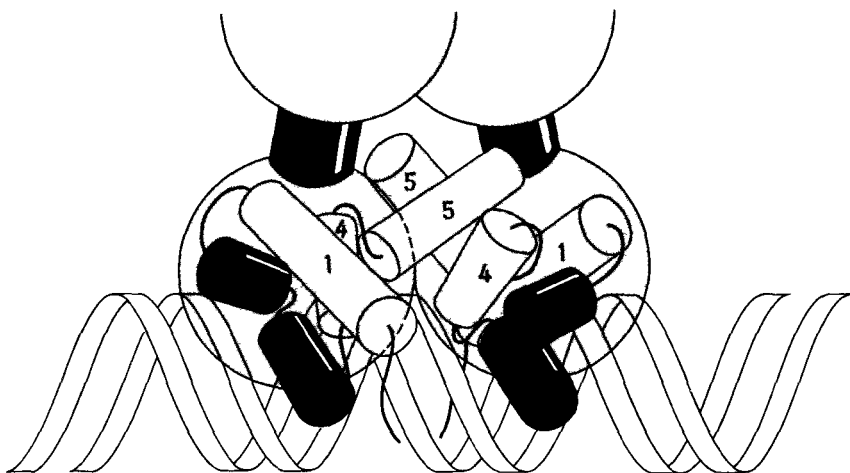


Рис. 2.6. Репрессор фага λ , связанный с операторным участком. Два аминоконцевых домена репрессора «подстраиваются» к операторному участку длиной 17 пар оснований.

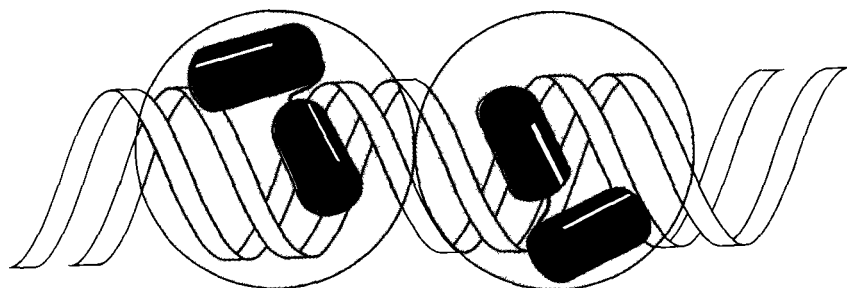


Рис. 2.7. Симметричное расположение биспиральных ДНК-связывающих элементов репрессора на операторе.

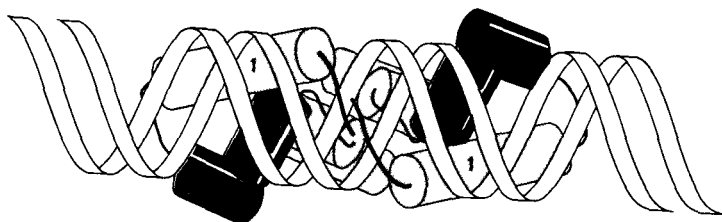


Рис. 2.8. «Руки» λ -репрессора. От конца каждой α -спирали 1 отходят цепочки из 7 аминокислот. Эти цепочки обхватывают ДНК и контактируют с основаниями, расположенными вблизи от центра операторного участка на его «задней» стороне. Обратите внимание, что двойная спираль ДНК повернута по сравнению со спиралью на предыдущем рисунке, чтобы показать ее с «задней» стороны.

В димере репрессора расстояние между узнающими спиральями (по одной в каждом мономере) соответствует расстоянию между двумя участками большого желобка, отстоящими друг от друга на период спирали, с одной стороны ДНК. На рис. 2.6 показано, что при сближении димера с ДНК каждая из узнающих спиралей укладывается в большой желобок. Таким образом, когда димер правильно расположен на операторном участке, симметрия белка соответствует симметрии ДНК.

Помимо узнающей α -спирали на рис. 2.5 и 2.6 выделена цветом еще одна α -спираль, спираль 2. На рис. 2.7 видно, что она не входит в большой желобок, а лежит поперек него. Спираль 2 помогает правильно уложить спираль 3 в большой желобок. Эти две α -спирали мы будем называть биспиральным элементом или биспиральной структурой. Как мы увидим далее, многие регуляторные белки используют подобный элемент, состоящий из пары α -спиралей, для связываний с ДНК.

Теперь мы в общих чертах понимаем, как репрессор избирательно связывается с оператором. Этот белок прочно связывается только в том случае, если имеется соответствие между боковыми цепями аминокислот в узнающей α -спирали 3 репрессора и функциональными группами ДНК, экспонированными в большой желобок. Чтобы уяснить роль симметрии в связывании, вспомним нашего демона, который определял, симметрична ли последовательность ДНК. Если бы демону пришлось пройти вдоль спирали 3 любого из мономеров от amino-конца к карбокси-концу, т.е. по направлению к спирали 4, он обнаружил бы одну и ту же (или почти одну и ту же) последовательность ДНК-белковых взаимодействий. (Оговорка «почти одна и та же» связана с тем, что последовательность каждого операторного участка не совсем симметрична.)

Помимо того что λ -репрессор встраивается в двойную спираль ДНК своими узнающими α -спиральями, он «обнимает» ее парой гибких «рук», расположенных на amino-конце мономеров. Когда репрессор связывается с оператором, его «руки» охватывают ДНК и образуют специфические контакты в большом желобке на ее обратной стороне. Узнающие α -спирали используются многими регуляторными белками, но «руки» λ -репрессора, изображенные на рис. 2.8, — пример менее распространенного приспособления для прочитывания последовательности.

Белок Cto

Структура Cto изображена на рис. 2.9. Этот белок включает три α -спирали, а также три участка, образующие так называемые β -слои. (β -Слой — еще один широко распространенный в белках способ укладки. На наших рисунках β -слои изобра-

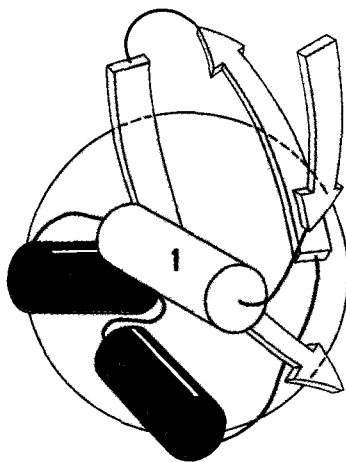


Рис. 2.9. Белок Cro. Три плоские стрелки—это β -слои, которые вместе с тремя α -спиралями образуют белковую глобулу.

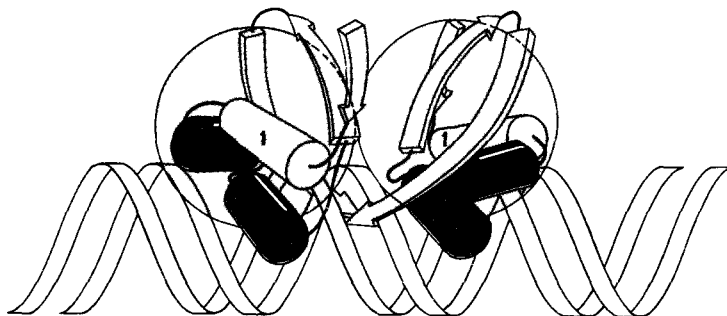


Рис. 2.10. Cro-белок, связанный с операторным участком. Этот димер присоединяется к ДНК примерно так же, как димер репрессора.

жены в виде плоских стрелок, чтобы их можно было отличить от α -спиралей, представляемых в виде цилиндров.)

Спираль 3 у Cro, как и у репрессора,— узнающая. Взаимное пространственное расположение спиралей 2 и 3 белка почти такое же, как и соответствующей пары спиралей репрессора. Поразительно, что в различных белках обнаруживаются биспиральные элементы со столь сходным расположением двух α -спиралей. В димере Cro симметрично расположенные узнающие спирали, по одной в каждом мономере, укладываются в два последовательных участка большого желобка, расположенных с одной стороны двойной спирали, как показано на рис. 2.10.

Взаимодействия аминокислот с парами оснований

Аминокислотные последовательности, образующие узнающие спирали репрессора и Cro, большей частью различны (рис 2 11) Этого и следовало ожидать В обоих случаях одна сторона спирали («внутренняя») соприкасается с основной частью белковой молекулы, а «внешняя» ложится в большой желобок ДНК и образует там специфические контакты Внутренние поверхности узнающих спиралей различаются, поскольку те основные части белковых молекул репрессора и Cro, с которыми они контактируют, различны Последовательности на внешних поверхностях узнающих спиралей сходны, но не идентичны хотя репрессор и Cro связываются с одними и теми же операторными участками, их относительное строение к различным участкам неодинаково

На рис 2 11 приведена также схема взаимодействий между аминокислотами узнающих спиралей репрессора и Cro и основаниями двух половин оператора Эта схема позволяет представить, каким образом репрессор и Cro узнают одни и те же операторные участки, но различают их репрессор предпочитает $O_R 1$, а Cro — $O_R 3$

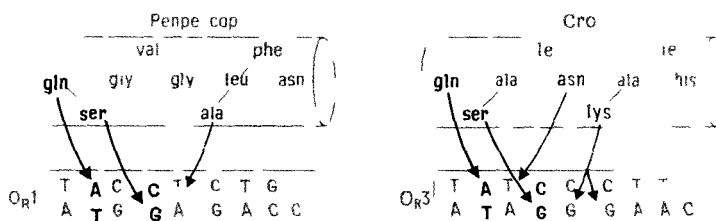


Рис 2 11А Взаимодействия аминокислот с парами оснований Чтобы понять как располагаются определенные аминокислотные остатки в этих узнающих спиральных участках и как они пронумерованы, сравните приведенную схему с рис 2 3 и 2 11Б В обоих белках боковые остатки (группы, обозначенные R) аминокислот 1 2 5 и 6 направлены в сторону ДНК а остатки 4 и 7 в сторону белковой глобулы И в репрессоре и в Cro белке консервативные аминокислоты в узнающих спиральных участках (Gln и Ser в положениях 1 и 2) контактируют с консервативными парами оснований оператора (положения 2 и 4) С основаниями в положении 3 оператора репрессор не контактирует а Cro предпочитает ТА пару паре CG В положении 5 репрессор предпочитает ТА пару паре CG а Cro наоборот В положении 8 «рука» репрессора, которая здесь не показана предпочитает CG пару ТА-паре Эти представления не исчерпывают всех возможных ситуаций Например аминокислота лежащая за концом спирального участка 3 может контактировать с парой оснований в положении 6 оператора В обоих случаях изображена только половина операторного участка Вторые половины соответствуют консенсус последовательности приведенной в табл 2 2

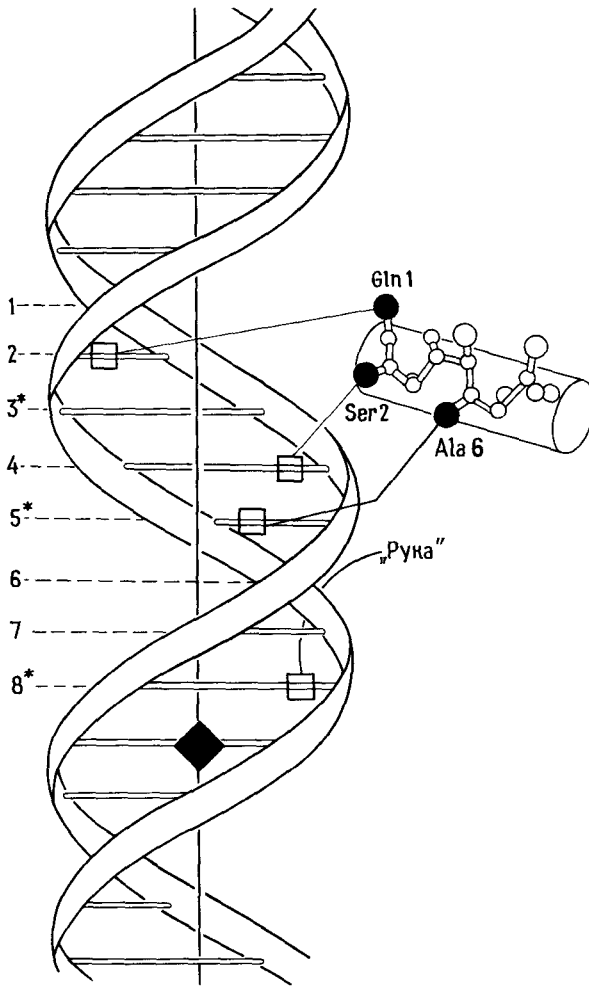
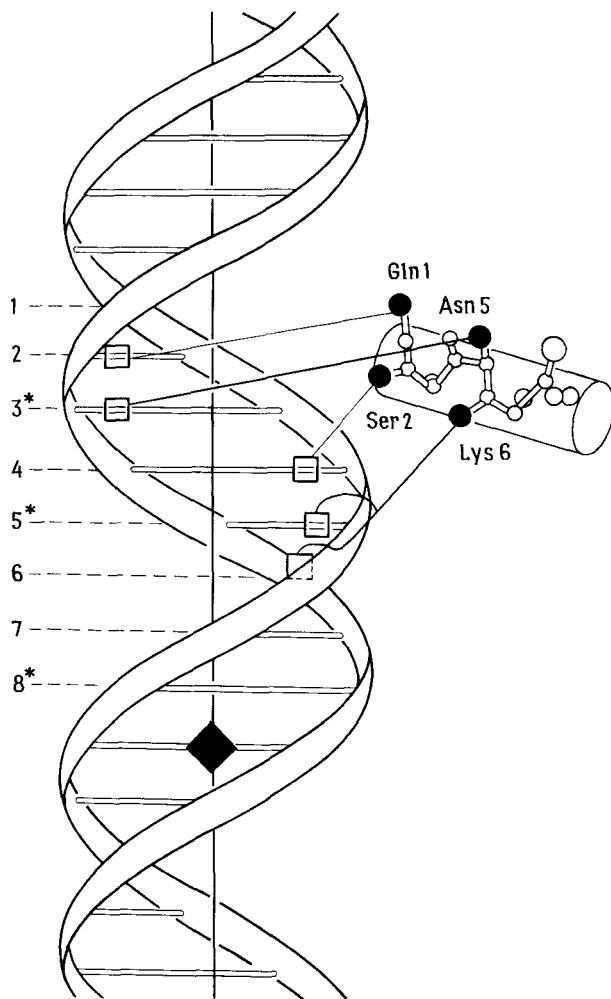


Рис 2 11Б Узнающие спирали вынуты из большого желобка ДНК, с которой они взаимодействуют. Обратите внимание на соответствие положений выступающих боковых групп аминокислот и оснований, с которыми они кон-

Обе узнающие спирали начинаются с дипептида глутамин-серин (Gln-Ser), а дальше последовательности различаются. Оба белка используют Gln в положении 1 и Ser в положении 2, чтобы образовать контакты с парами оснований 2 и 4 оператора соответственно. Это как раз те положения в

Белок Сго фага λ



тактируют Основания оператора пронумерованы так же, как в табл 2.2, и три пары оснований, по которым различаются O_R1 и O_R3 , отмечены звездочками
Черным ромбиком обозначен центр симметрии оператора

операторе, которые, как показано в табл. 2.2, одинаковы во всех операторных половинах. Таким образом, репрессор и Сго используют одни и те же аминокислоты для контактов с идентичными основаниями во всех операторных участках.

Другие аминокислоты в узнающих спиралях позволяют

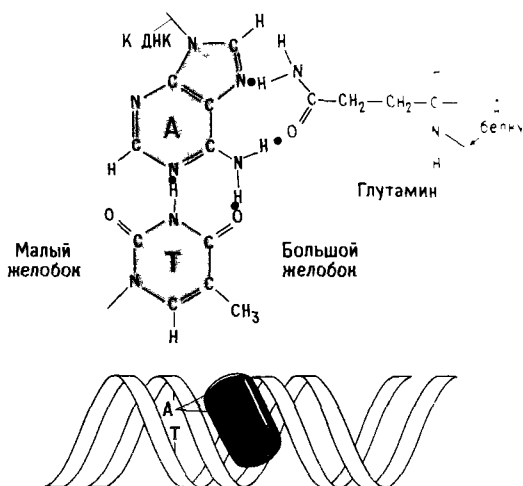


Рис. 2.12 Взаимодействие одной из аминокислот с парой оснований. Изображено контактирование глутамина с основанием А со стороны большого желобка. Между боковой цепью аминокислоты и экспонированными атомами основания образуются две водородные связи.

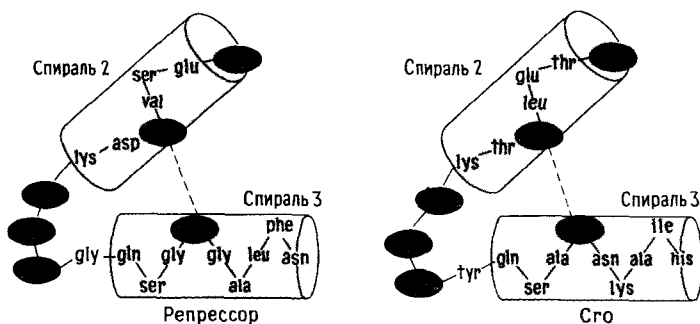


Рис. 2.13. Консервативные аминокислоты в биспиральных узнающих элементах репрессора и белка Cro. В спирали 2 обоих белков имеется аминокислота (ala), которая взаимодействует с другой аминокислотой в спирали 3. В репрессоре ala взаимодействует с валином, а в Cro – с изолейцином. Эти связи обеспечивают правильное взаимное расположение спиралей. Той же цели служат аминокислоты мостика, соединяющего два спиральных участка. Боковая цепь метионина сходна с боковыми цепями лейцина и валина

двум белкам различать операторные участки. Так, аланин (Ala) репрессора контактирует с основанием в положении 5, а аспарагин (Asn) и лизин (Lys) в Cro – с основаниями 3 и 5 соответственно. (Lys в белке Cro, кроме того, контактирует с основанием 6.) Обратите внимание, что пары оснований в этих положениях в двух операторных половинах различаются.

«Руки» λ -репрессора контактируют с основаниями 8 и 9 оператора и также помогают репрессору различать разные операторные участки.

На рис. 2.12 изображено более детально взаимодействие одной из аминокислот с парой оснований, отмеченное схематически на рис. 2.11. Gln образует две связи с атомами аденина (A), экспонированными в большой желобок.

На рис. 2.13 показано, какие аминокислоты биспиральных элементов репрессора и белка σ_{70} , находящиеся в одинаковом положении, совпадают или химически родственны (консервативны). (Эти консервативные аминокислоты не участвуют в узнавании специфических последовательностей.) Три из этих аминокислот расположены в изгибе, соединяющем две спирали, а две аминокислоты, соединенные на рисунке прерывистой линией, лежат по одной из каждой спирали. Эти остатки обеспечивают, по всей вероятности, постоянство угла между двумя спиралями. Шестой консервативный остаток расположен на «вершине» спирали, которая предшествует узнающей спирали. Он взаимодействует с фосфатной группой остова одной из цепей ДНК, обеспечивая тем самым правильное положение биспирального элемента относительно ДНК.

Многие известные и предполагаемые специфические ДНК-связывающие белки из целого ряда организмов имеют такое же или очень близкое расположение консервативных остатков, как репрессор λ и σ_{70} . В некоторых случаях такое расположение аминокислот использовалось в качестве теста на существование биспирального элемента, частью которого является узнающая спираль. Сходство не захватывает всю область биспирального элемента, а ограничивается лишь отдельными участками, которые, очевидно, фиксируют взаимное пространственное положение спиралей.

Репрессор λ и σ_{70} связываются со своими операторами очень прочно; мы еще вернемся к этому в гл. 4 и в приложении 1. До сих пор мы обращали внимание главным образом на те взаимодействия, которые обеспечивают специфические контакты функциональных групп ДНК и аминокислот узнающей α -спирали, а в случае λ -репрессора — аминокислот, расположенных на концах гибких «рук». Однако прочность связывания — по крайней мере частично, а может быть, и в основном — обусловлена взаимодействием других участков белковой молекулы с ДНК. Например, когда λ -репрессор сближается со своим оператором, белок взаимодействует с фосфатными группами остова двойной спирали ДНК, отмеченными на рис. 2.14. Эти и другие сильные взаимодействия возможны только в том случае, если группы белка, определяющие специфичность, находят те группы ДНК, с которыми они должны взаимодействовать.

Мы только начинаем понимать, какие взаимодействия

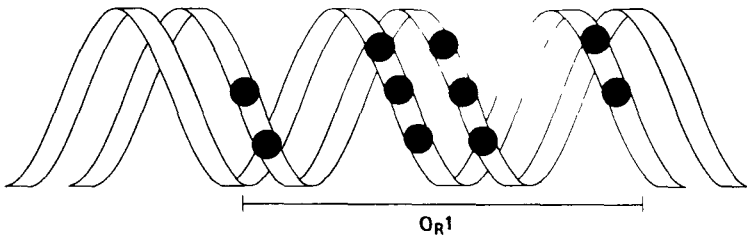


Рис. 2.14. Фосфатные группы, контактирующие с репрессором, связывающимся с операторным участком O_{R1} . Эти группы располагаются с одной стороны двойной спирали, симметрично относительно оси второго порядка, проходящей через середину оператора. С некоторыми из этих фосфатов контактирует Cro .

боковых цепей аминокислот с основаниями обеспечивают специфическое связывание. По-видимому, в любом мономерном белке специфичность определяется не более чем 3–4 аминокислотами. Всегда ли узнающая спираль в точности комплементарна ДНК, так что аминокислоты в строго определенных положениях взаимодействуют с основаниями ДНК в строго определенных положениях оператора? Существует ли простой код, описывающий взаимодействия аминокислот с основаниями?

До сих пор мы рассматривали ДНК как жесткую палочку, т.е. весьма упрощенно. Например, мы знаем, что точные параметры спиральной структуры ДНК до некоторой степени зависят от нуклеотидной последовательности. Будет ли это сказываться сколько-нибудь заметно на ДНК-белковых взаимодействиях? Не исключено, например, что основания, не контактирующие непосредственно со связанным белком, тем не менее влияют на связывание, слегка изменяя локальную структуру ДНК или ее гибкость. Насколько важны эти факторы, мы до сих пор не знаем.

Промотор

Фермент РНК-полимераза *E. coli* узнает многие промоторы, расположенные в начале самых разных генов. Напомним (см. введение), что промотор занимает около 60 пар оснований, в том числе 20 пар оснований за местом начала транскрипции (т.е. по ее ходу). Вообще говоря, двух одинаковых промоторных последовательностей не существует, но все они содержат два характерных участка: один из них расположен за 10 пар оснований до точки начала транскрипции, а второй – примерно за 35 пар оснований до этого места. Первое основание ДНК, которое копируется в виде РНК, принято обозначать номером +1, так что середины этих консервативных про-



Рис. 2.15. Консенсус-последовательность промотора. Этот промотор обеспечивает транскрипцию слева направо. Первое транскрибируемое основание обозначается +1; -10 и -35-основания, лежащие до начала транскрипции. Консервативную последовательность в области -10 иногда называют ТАТА-последовательностью. Расстояние между консервативными элементами различных промоторов (ТАТА и областью -35) колеблется от 15 до 18 пар оснований, причем оптимально расстояние в 17 пар.

моторных последовательностей находятся в положениях -10 и -35.

Сравнивая последовательности многих промоторов, мы можем построить консенсус-промотор; два консервативных его участка показаны на рис. 2.15. Последовательность любого промотора в областях -10 и -35 более или менее сходна с этими консенсус-последовательностями.

Полимераза контактирует с участками промотора, лежащими на одной стороне двойной спирали в области примерно -10 ÷ -40. На участке от -10 до +1 двойная спираль раскрыта, так что одну из цепей можно скопировать в виде мРНК. Структурные особенности полимеразы, которые позволяют ей избирательно связываться с промоторами, неизвестны.

Как правило, промотор, последовательность которого в областях -10 и -35 близка к консенсус-последовательности, хорошо работает. Но если наблюдаются сильные различия, полимеразы обычно нуждается в белке-активаторе, который помогает ей связаться и начать транскрипцию.

В табл. 2.3 сопоставляются промоторы λ , P_R и P_{RM} с консенсус-последовательностью. Для P_R наблюдается лучшее совпадение и в области -10, и в области -35, чем для P_{RM} . Возможно, именно по этой причине РНК-полимераза эффективно связывается с P_R и начинает с него транскрипцию без всяких регуляторных белков, в то время как для связывания и транскрипции с P_{RM} необходим дополнительный белок- λ -репрессор, связанный с $O_R 2$.

Таблица 2.3. Сравнение последовательностей промоторов фага λ с консенсус-промотором. Различающиеся основания выделены цветом

Консенсус-промотор	-35	-10
P_R	T T G A C A	-17bp - T A T A A T
P_{RM}	T A G A T A	-17bp - T A G A T T
λP_R	T T G A C T	-17bp - C A T A A T

Регуляция генов

Теперь мы подготовлены к тому, чтобы понять, как должны быть расположены последовательности промотора и оператора, чтобы репрессор и σ могли действовать так, как это описано в гл. 1. Помимо того, что мы имеем представление о последовательностях промотора и оператора, нам известна детальная структура комплексов репрессора с оператором и σ с оператором.

На рис. 2.16 приведена последовательность ДНК между генами cI и cro . Сравните этот рисунок с рис. 1.4 и обратите внимание на перекрытие последовательностей промоторов и оператора. Как мы уже видели в гл. 1 (рис. 1.13), если $O_R 1$ занят репрессором или σ , полимеразы вытесняется с P_R , поскольку любой связанный белок закрывает часть поверхности двойной спирали, которую занимает РНК-полимераза. То же самое справедливо и для $O_R 3$: любой регуляторный белок блокирует связывание РНК-полимеразы с P_{RM} . Что касается $O_R 2$, то здесь ситуация сложнее.

Напомним (гл. 1), что $O_R 2$ участвует как в позитивной, так и в негативной регуляции: при связывании с этим участком репрессор выключает P_R и стимулирует P_{RM} . Механизм негативной регуляции обычен: репрессор, связанный с $O_R 2$, закрывает часть поверхности ДНК, которая должна быть доступна для связывания полимеразы с P_R . Участок промотора, который покрывается репрессором, в этом случае меньше, чем при заполнении $O_R 1$, но даже этого достаточно для репрессии.

Как же репрессор, связанный с $O_R 2$, стимулирует транскрипцию? На рис. 2.16 видно, что $O_R 2$ на одну пару оснований ближе к P_R (считая от точки начала транскрипции), чем к P_{RM} . Благодаря этому репрессор, связанный с $O_R 2$, совершенно не закрывает поверхность P_{RM} , необходимую для связывания полимеразы. Вместо этого репрессор, связанный с $O_R 2$, сближается и контактирует с РНК-полимеразой, связанной с P_{RM} . Как отмечалось в гл. 1 (рис. 1.12), это взаимодействие помогает полимеразе связаться и начать транскрипцию с P_{RM} .

Поверхность репрессора, которая контактирует с полимеразой и осуществляет позитивную регуляцию, изображена на рис. 2.17. Конфигурация аминокислот на этом участке поверхности оптимальна для взаимодействия с полимеразой, и если их заменить, то репрессор сохранит способность связываться с $O_R 2$, но уже не будет стимулировать транскрипцию с P_{RM} . Можно думать, что если бы $O_R 2$ располагался на одну пару оснований ближе к P_{RM} подобно тому, как он расположен относительно P_R , то репрессор, связанный с $O_R 2$, блокировал бы связывание полимеразы с P_{RM} , а не способствовал ему.

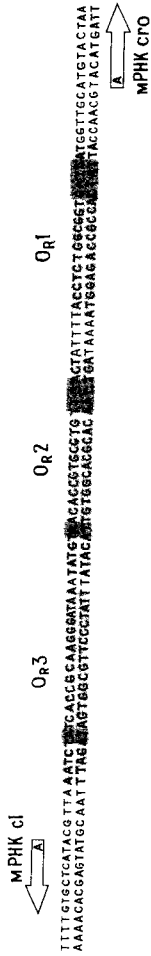


Рис. 2 16 Линейное расположение промоторов и операторных участков в области O_R . Некоторые пары оснований, находящиеся между генами $c1$ и $c2$, выполняют двойную функцию. Например, три пары оснований, входящие в состав O_{R2} , являются также частью области — 35 промотора P_R .

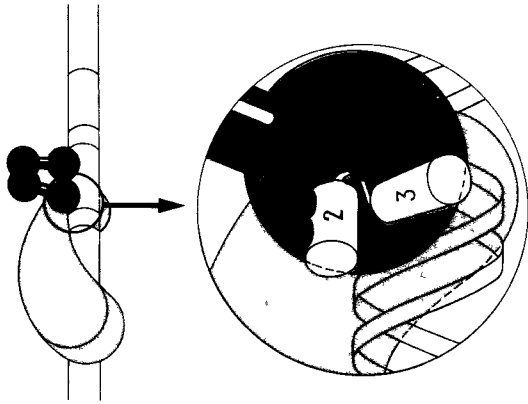


Рис. 2 17 Репрессор λ как активатор транскрипции. Аминокислотные остатки репрессора, которые взаимодействуют с полимеразой и стимулируют ее активность, расположены вдоль спирали 2 и в области поворота, соединяющего спирали 2 и 3

Белок $\text{C}_{\text{го}}$, связанный с $O_{\text{R}} 2$, также блокирует связывание полимеразы с P_{R} . $\text{C}_{\text{го}}$, сидящий на $O_{\text{R}} 2$, закрывает такую же часть P_{R} , как и репрессор. Если $\text{C}_{\text{го}}$ связывается только с $O_{\text{R}} 2$ (это искусственная ситуация, которую можно создать экспериментально), он не в состоянии стимулировать P_{RM} . Объясняется это тем, что, хотя $\text{C}_{\text{го}}$ может занимать нужное положение, чтобы контактировать с полимеразой, он не имеет необходимых аминокислот на поверхности контакта, чтобы оказывать стимулирующее действие.

Следует отметить, что рассмотрение линейных плоских изображений последовательностей операторов и промоторов может вводить в заблуждение. Например, судя по рис. 2.16, $O_{\text{R}} 2$ закрывает оба промотора, и P_{R} , и P_{RM} , так что связанный репрессор должен их оба подавлять. Анализ пространственной структуры ясно показывает, что белки могут узнавать перекрывающиеся последовательности, но связываться с разных сторон двойной спирали ДНК.

Из сказанного в этой главе можно заключить, что белок подавляет промотор в том случае, когда он закрывает часть поверхности двойной спирали ДНК, с которой должна связываться полимеразы. Существуют разные варианты организации последовательностей оператора и промотора, способные обеспечить репрессию, но в любом случае последовательности должны перекрываться так, чтобы каждая из них могла выполнять свою функцию.

Для позитивной регуляции необходимо взаимодействие между связанным регуляторным белком и полимеразой. На поверхности регуляторного белка, соприкасающейся с полимеразой, должны располагаться соответствующие аминокислоты. Поверхность, взаимодействующая с полимеразой, отличается от поверхности, связывающей ДНК. Эти функции – связывание с ДНК и позитивный контроль – можно разделить: два белка могут связываться с ДНК одинаковым образом, но только один из них способен к позитивной регуляции.

Литература: обзоры

- 1 *Hawley D K McClure W R* Compilation and analysis of Escherichia coli promoter DNA sequences, *Nucl Acids Res*, **11**, 2237–2255 (1983)
- 2 *Maniatis T, Ptashne M* A DNA operator-repressor system, *Sci Amer*, **234**, 64–76 (1976)
- 3 *Pabo C O, Sauer R T* Protein-DNA recognition, *Ann Rev Biochem*, **53**, 293–321 (1984)
- 4 *Ptashne M, Johnson A D, Pabo C O* A genetic switch in a bacterial virus, *Sci Amer*, **247**, 128–140 (1982)
- 5 *Siebenlist U, Simpson R B, Gilbert W* Escherichia coli RNA polymerase interacts homologically with two different promoters, *Cell*, **20**, 269–281 (1980)

Регуляторные механизмы и жизненный цикл фага

Многие вирусы размножаются только одним способом. Вскоре после заражения клетки-хозяина вирусные гены начинают активно функционировать: синтезируются новые белки, которые многократно реплицируют вирусные хромосомы, упаковывают их в вирусные частицы и лизируют клетку.

Как мы уже говорили, фаг λ способен размножаться таким литическим способом, но у него есть и другой, более изощренный путь развития. В лизогенной бактерии фаговые гены, необходимые для литического цикла, выключены и фаговая хромосома пассивно реплицируется белками, которые закодированы в бактериальной хромосоме и синтезируются в клетке. При этом переключатель генов «установлен» в таком положении, что в клетке имеется только один фаговый белок – репрессор (гл. 1). Напомним, что репрессор выключает все прочие фаговые гены, одновременно включая собственный ген *cI*. Это устойчивое положение нарушается под действием индуцирующих воздействий (например, ультрафиолетового излучения), которые переводят переключатель в альтернативное положение путем разрушения репрессора. В результате начинается литический цикл развития.

В этой главе обсуждаются в основном два вопроса, касающиеся регуляции генов фага λ .

● Во-первых, каким образом фаг λ , инфицировав бактериальную клетку, «принимает решение»: начать литический цикл размножения или лизогенизировать клетку? По-видимому, размножаться «втихомолку» в виде лизогена – полезная уловка для фага, когда нет оптимальных условий для бурного литического роста.

● Во-вторых, каким образом фаг λ регулирует работу своих генов по мере развития в обоих случаях?

Если после заражения фаг становится на литический путь развития, он должен вначале синтезировать ДНК, упаковать ее и, наконец, лизировать клетку, постоянно подавляя синтез репрессора. При индукции лизогена профаг должен решить еще одну задачу, прежде чем перейти к литическому росту:

синтезировать особый белок, необходимый для вырезания профага из хозяйской хромосомы.

Когда же фаг начинает процесс лизогенизации, он, наоборот, должен синтезировать ферменты, которые интегрируют его в хозяйскую хромосому, и начать синтез репрессора, подавляя в то же время экспрессию различных литических генов. Другими словами, переключатель генов, описанный в гл. 1, должен быть переведен в положение «лизогения».

Выбор между литическим и лизогенным путями – яркий пример влияния окружающей среды на выбор пути развития. Как мы увидим в дальнейшем, первые несколько этапов регуляции генов после заражения фагом λ одинаковы независимо от того, лизирует ли фаг в конце концов клетку или лизогенизирует ее. На критическом для клетки этапе фаговый регуляторный белок «чувствует» состояние хозяйской клетки, и дальнейшие события направляются по одному из двух путей.

Мы увидим, что независимо от того, развивается ли фаг λ по литическому пути или переходит к лизогении, регуляция его генов организована в виде каскада: обычно один регуляторный белок включает или выключает группу генов; в эту группу, как правило, входит другой регуляторный ген, продукт которого в свою очередь активирует или подавляет новую группу генов, и т. д.

Вначале мы кратко опишем работу хромосомы фага λ во время литического и лизогенного путей. Затем подробнее обсудим экспрессию генов λ и вернемся к вопросу о том, как принимается решение о выборе между лизисом и лизогенией.

Краткое описание развития фага

Генетическая карта

На рис. 3.1 приведена упрощенная генетическая карта фага. На ней указаны только шесть генов: это регуляторные гены *cI*, *cII*, *cIII*, *N*, *cro* и *Q*. Остальные гены сгруппированы в соответствии с функциями белков, которые они кодируют.

Область «репликация» включает два гена, необходимые для репликации ДНК. В области «лизис» расположены три гена, продукты которых ответственны за лизис бактерии. Область «рекомбинация» содержит около 10 генов, в том числе два гена, продукты которых осуществляют интеграцию фаговой хромосомы в хозяйскую хромосому при лизогенизации и вырезании ее при индукции. Примерно 10 генов в области «головка» кодируют белки, из которых строится головка фага; еще 12 генов кодируют белки хвостового от-

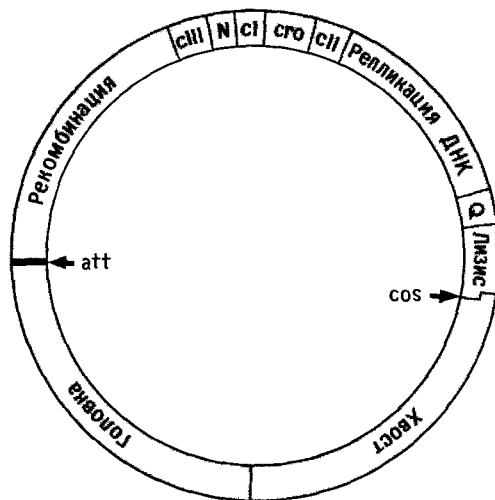


Рис. 3.1. Хромосома фага λ . Как правило, гены с родственными функциями расположены рядом. Регуляция генов в пределах каждой такой группы обычно скоординирована. На карте отмечены шесть регуляторных генов и два регуляторных участка, *att* (участок интеграции) и *cos* (липкие концы).

ростка. При обсуждении роста фага λ мы рассмотрим некоторые из этих генов по отдельности.

Циклизация

Генетическая карта на рис. 3.1 изображена в виде кольца, так как хромосома, которая в составе фаговой частицы является линейной, сразу после проникновения в клетку замыкается в кольцо (рис. 3.2). Концы хромосомы фага λ , так называемые липкие концы, соединяются под действием бактериального фермента, и образуется пара непрерывных длинных переплетенных кольцевых цепей ДНК. В результате этого соединения группы генов лизиса и хвостового отростка сближаются. В конце литического цикла, когда новые фаговые хромосомы упаковываются в новые фаговые головки, концы хромосомы снова расходятся.

Экспрессия генов

Общая схема экспрессии генов во время роста λ приведена на рис. 3.3. Первые две стадии развития – предранняя и ранняя –

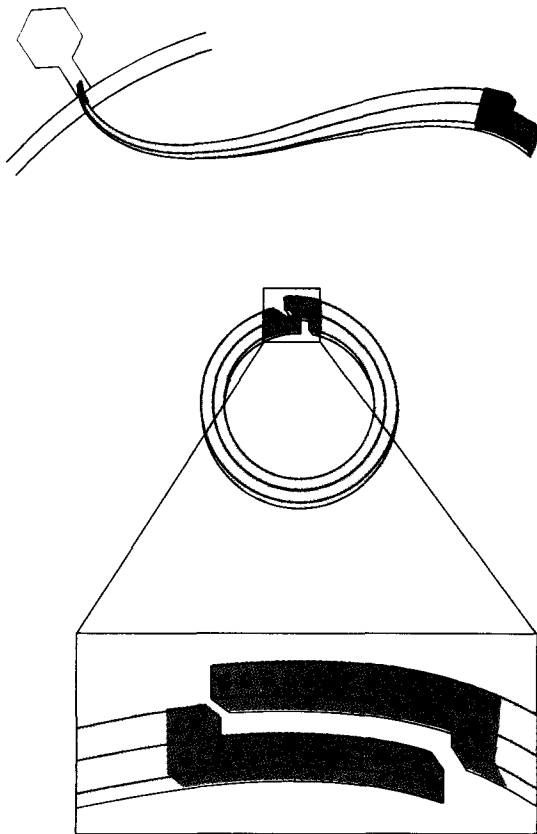


Рис. 3.2. Циклизация хромосомы фага λ . Липкие концы представляют собой одноцепочечные участки ДНК длиной 12 нуклеотидов. Они спонтанно соединяются, а бактериальные ферменты сшивают цепи, образуя кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК.

предшествуют стадии принятия решения о выборе между лизисом и лизогенией. Мы можем представить картину экспрессии генов в общем виде следующим образом.

Предранние

Работают только гены N и cro .

Ранние

Число активных генов увеличивается: подключаются гены рекомбинации и репликации ДНК.

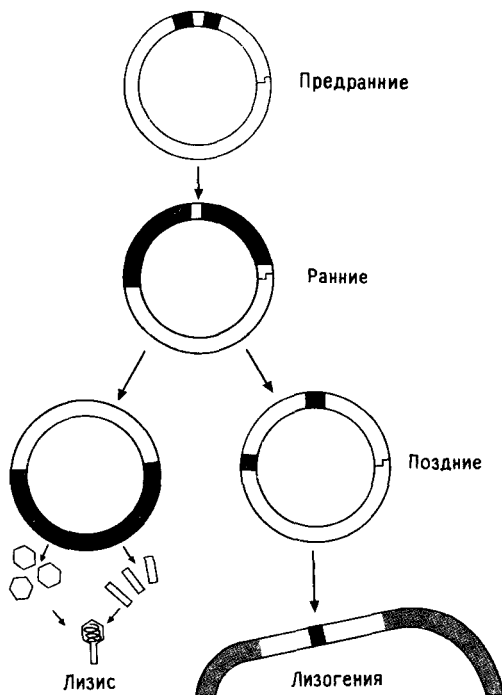


Рис 3.3 Пути экспрессии генов. Гены, включающиеся на указанных стадиях роста, отмечены цветом. Гены, кодирующие родственные функции, включают-ся и выключаются совместно. Такие гены располагаются протяженными блоками, исключение составляет поздняя стадия лизогенного пути развития, когда активны только два гена, *cI* и *int*.

Поздние

На этом этапе пути расходятся.

● Если фаговая хромосома находится на литическом пути, ранние гены выключаются и включаются гены головки, хвостового отростка и лизиса. При лизисе из бактериальной клетки высвобождаются новообразованные фаговые частицы.

● Если фаг переходит к лизогении, включены только два гена, *cI* и *int*. Продукт гена *int*, расположенного в области рекомбинации, ответствен за интеграцию фаговой хромосомы в хозяйскую хромосому. В конце концов в лизогене оказывается активным один-единственный ген репрессора, *cI*.

Интеграция

На рис. 3.4 показано, как в результате одного акта рекомбинации хромосома λ встраивается в гораздо большую хозяйскую хромосому. Этот процесс происходит только в том случае, если фаг лизогенизирует хозяина. Каждая из двух молекул ДНК расщепляется в одном месте, и их концы воссоединяются так, что образуется непрерывная молекула лизогенной хромосомы. Место кроссинговера в фаговой хромосоме находится в участке *attP* (от англ. *phage attachment* – место присоединения фага), а в бактериальной хромосоме – в участке *attB*. При индукции лизогена происходит обратный процесс: хромосома λ вырезается из хозяйской хромосомы и замыкается в кольцо.

Изображая схематически процессы интеграции и эксцизии (вырезания), мы предполагали, что в них участвуют только

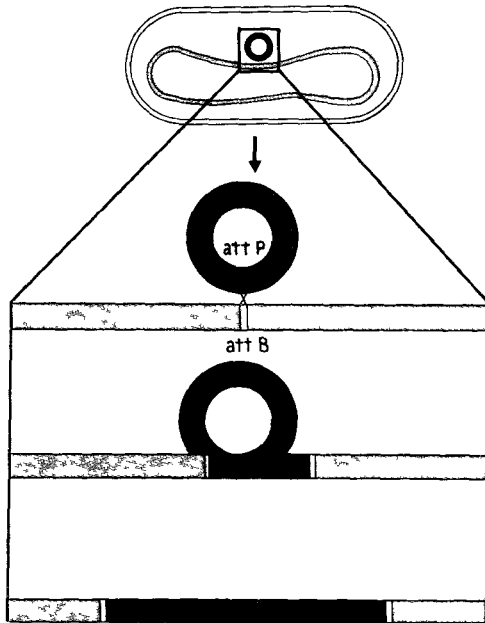


Рис 3.4 Интеграция фаговой ДНК с бактериальной хромосомой по участкам *attP* и *attB*, в результате чего встроенная фаговая хромосома – профаг оказывается фланкированной двумя участками *att*. Эксцизия процесс, обратный интеграции, приводит к тому, что из одной кольцевой хромосомы лизогена образуются две кольцевые молекулы ДНК – фаговая и бактериальная. Белки, катализирующие соответствующие реакции, на рисунке не показаны. Модель названа именем Кемпбелла – ученого, который первым подробно описал, каким образом ДНК встраивается в хозяйскую хромосому и вырезается из нее

молекулы ДНК; на самом деле они протекают при участии фаговых белков, которые работают вместе с некоторыми белками клетки-хозяина. Интеграцию осуществляет фаговый белок *Int*, а вырезание идет при совместном участии белков *Int* и *Xis*.

Регуляция транскрипции

Рассмотрим теперь действие регуляторных белков фага на различных стадиях его роста, перечисленных на рис. 3.3. Рисунок иллюстрирует, какие активные регуляторные белки и соответственно мРНК синтезируются на каждой стадии. Первые две стадии одинаковы независимо от того, по какому пути пойдет фаг – по пути лизиса или лизогении.

Предранняя стадия

РНК-полимераза клетки-хозяина связывается с двумя промоторами фаговой хромосомы, P_L и P_R , и начинает транскрипцию. На рис. 3.5 показано, что эти транскрибирующие

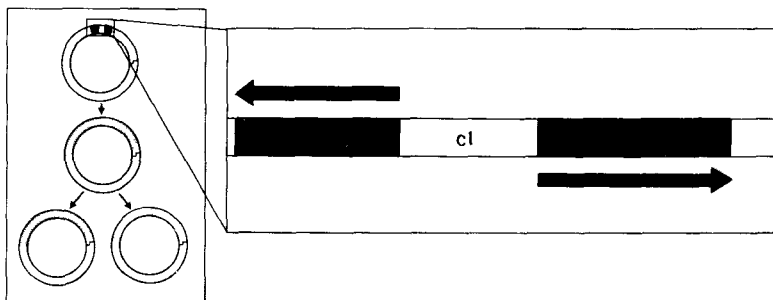


Рис. 3.5. Предранние события. Сразу после заражения бактериальная РНК-полимераза транскрибирует гены *N* и *cro* с разных цепей ДНК. (На рисунке допущена ошибка: у левого нижнего кольца должна быть закрашена нижняя половина, а не верхняя.)

РНК-полимеразы останавливаются в конце генов *N* и *cro* соответственно. Происходит трансляция мРНК *N* и *cro* с образованием соответствующих белков.

Ранняя стадия

Белок *N* осуществляет позитивную регуляцию. Из рис. 3.6 видно, что он включает гены слева от *N*, в том числе *cIII* и гены рекомбинации, и гены справа от *cro*, в том числе гены *cII* и гены репликации ДНК *O*, *P* и *Q*, и не включает гены головки, хвостового отростка и *R* с эффективностью, достаточной для литического роста.

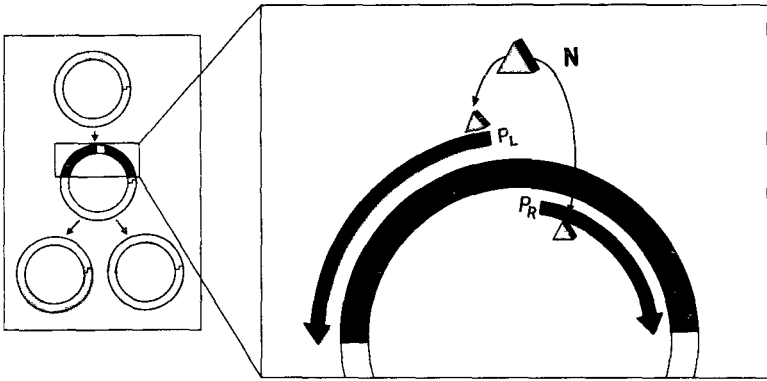


Рис 36 Ранние события Белок N включает ранние гены, расположенные слева от гена *N* и справа от гена *cro* Треугольник, изображающий белок N, расположен над самым началом мРНК, транскрипция которой идет налево, но на некотором расстоянии от начала мРНК, которая считывается направо (объяснение см в тексте)

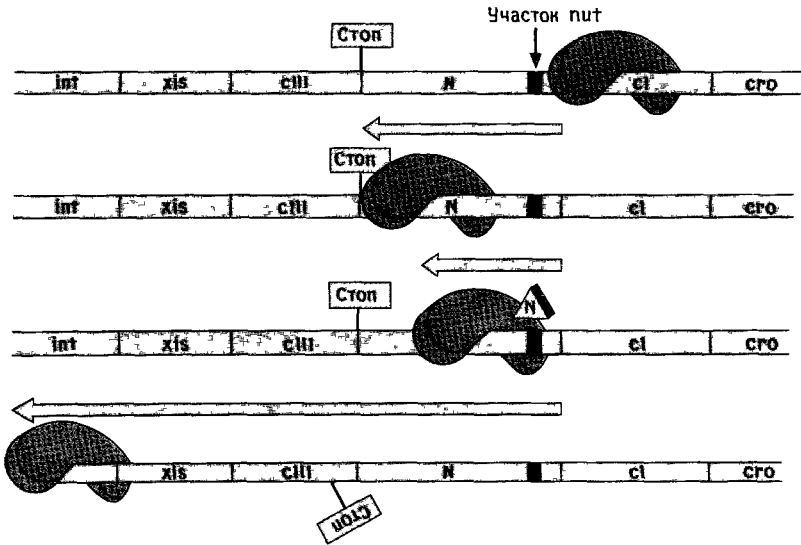


Рис 37 Действие белка N В отсутствие этого белка полимеразы не реагирует на сайт *Nut* и, достигая сигнала терминции синтеза, высвобождает мРНК и отсоединяется от ДНК В присутствии же белка N полимеразы, пройдя сайт *Nut*, пропускает сигнал терминции

Действие N в качестве позитивного регулятора в корне отличается от аналогичного действия репрессора, описанного в гл. 1. Белок N придает РНК-полимеразе способность осуществлять транскрипцию через те области ДНК, на которых в его отсутствие происходит терминация (обрыв) синтеза мРНК. N называют антитерминатором. В присутствии белка N наблюдается успешный синтез протяженных молекул мРНК на генах N и cro и в результате включаются соседние (фланкирующие) гены.

Детальный механизм действия белка N не установлен. Мы знаем, что он узнает специфическую последовательность *Nut* (от англ. *N utilization* – использование белка N); когда полимеразы проходит через эту последовательность, она, очевидно, модифицируется под действием белка N , поскольку при дальнейшем продвижении пропускает многие (хотя и не все) последующие сигналы терминации. Один участок *Nut* расположен между P_L и началом гена N , а другой находится рядом с геном cro у самого его правого конца. На рис. 3.7 особо отмечен тот факт, что участок, узнаваемый белком N (*Nut*), отличен от того места, где собственно происходит анти-терминация.

На этом этапе дальнейшие пути расходятся. При литическом росте работают белки Q и $Сго$, а при лизогении – $СII$, $СIII$ и в конце концов $СI$. Опишем теперь, как проявляется активность этих двух групп регуляторных белков, а затем вернемся к вопросу о том, как принимается решение об экспрессии той или другой группы.

Поздняя стадия литической инфекции

Из рис. 3.8 видно, что белок Q включает поздние гены – гены лизиса и белков головки и хвостового отростка. Q работает подобно N , с тем отличием, что он подавляет терминацию вполне определенной небольшой РНК, которая начинается с промотора P'_R , расположенного за геном Q у самого его правого конца. Короткая (оборванная) мРНК синтезируется под действием бактериальной РНК-полимеразы. Если Q осуществляет анти-терминацию, то синтез этой мРНК идет по кольцевой фаговой хромосоме через гены головки и хвостового отростка.

Тем временем белок $Сго$ связывается прежде всего с $O_R 3$, как описано в гл. 1, чтобы подавить дальнейший синтез репрессора. Затем он связывается со вторым оператором, O_L , и выключает транскрипцию с промотора P_L , а также с другими участками оператора O_R и подавляет P_R . Итак, после первоначального бурного синтеза эти ранние транскрипты, идущие налево и направо, подавляются белком $Сго$. На поздней стадии накапливается достаточное количество белка

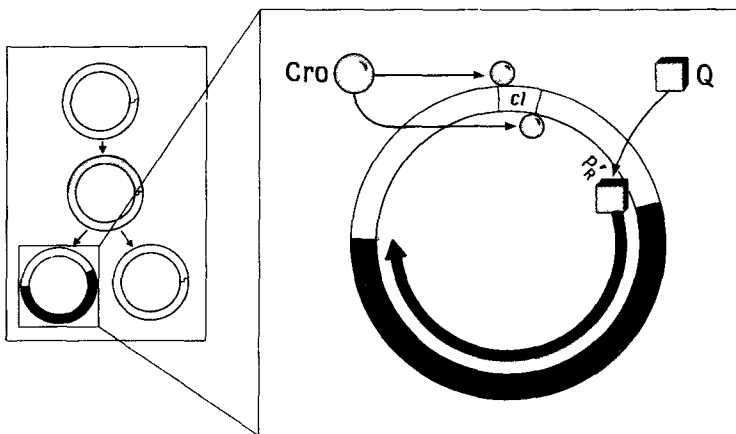


Рис. 3.8. Поздняя стадия лизиса. Участок, который узнает белок Q, Q_{int} , расположен в непосредственной близости к началу длинного транскрипта, который инициируется на промоторе P'_R . Полимераза, модифицированная белком Q, транскрибирует поздние гены в виде одного длинного транскрипта.

Q, чтобы активировать образование белковых оболочек, в которые упаковываются новообразованные молекулы ДНК λ . Бактериальная клетка разрушается, и новые фаговые частицы выходят в среду.

Поздняя стадия лизогении

Как видно из рис. 3.9, продукт гена cII включает гены cI и int . Белок CII работает как активатор генов, подобно репрессору λ ; он способствует связыванию РНК-полимеразы и началу транскрипции на двух промоторах, P_{RE} и P_I , которые без этого белка бездействуют.

Теперь мы можем ответить на вопрос, поставленный в гл. 1. Мы видели, что репрессор включает свой собственный ген, поддерживая тем самым постоянный синтез репрессора при лизогении. Как же начинается синтез репрессора в отсутствие самого репрессора? Дело в том, что ген cI может транскрибироваться с одного из двух промоторов, один из которых активируется репрессором, а второй – белком CII.

Напомним, что при лизогении репрессор стимулирует транскрипцию с P_{RM} (от англ. *promoter for repressor maintenance* – промотор для поддержания концентрации репрессора). Однако в клетке, где нет репрессора, белок CII заставляет полимеразу транскрибировать ген cI с другого промотора, P_{RF} (от англ. *promoter for repressor establishment* – промотор для первоначального синтеза репрессора). Начиная с P_{RE} , полимеразы осуществляет транскрипцию налево до конца гена репрессора cI . При трансляции этой мРНК образуется репрес-

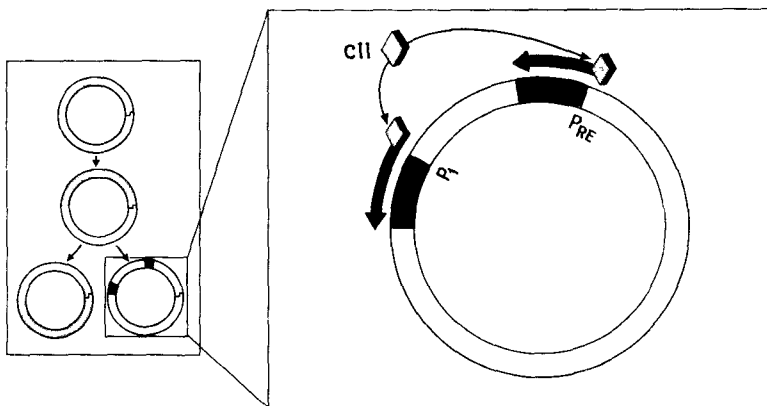


Рис. 3.9. Поздняя стадия лизогении. Белок СII направляет транскрипцию двух генов, необходимых для установления лизогенного состояния. На этой стадии ранние гены, по-видимому, еще включены, но их транскрипты на рисунке не показаны.

сор (но не белок Cro, так как ген *cro* транскрибируется в обратном направлении).

Заставляя полимеразу «стартовать» с другого промотора, P_I , СII стимулирует транскрипцию гена *int* в левую сторону. Продукт гена *int* обеспечивает встраивание фаговой хромосомы в хозяйскую хромосому.

Репрессор, синтезированный при трансляции мРНК, которая была инициирована на промоторе P_{RE} , связывается с O_L и O_R . В результате связывания с этими двумя участками репрессор стимулирует транскрипцию своего собственного гена с P_{RM} и выключает все остальные фаговые гены. При лизогении поздние гены выключены, так как нет белка Q, а ген Q выключен, потому что выключен ген *N*.

Регуляторный каскад фага λ контролируется регуляторными белками, которые действуют всего в нескольких участках фаговой хромосомы. Это становится возможным потому, что гены, кодирующие родственные белки (функции), собраны вместе и транскрибируются в одном направлении.

Принятие решения

Теперь, когда мы описали два пути развития, которые открываются перед фагом λ после проникновения его в бактериальную клетку, мы можем спросить: чем же определяется выбор этих путей? Какие факторы заставляют систему идти по пути лизиса или лизогении?

У нас нет полной ясности в этом вопросе, но мы можем составить весьма правдоподобный сценарий. Если говорить в

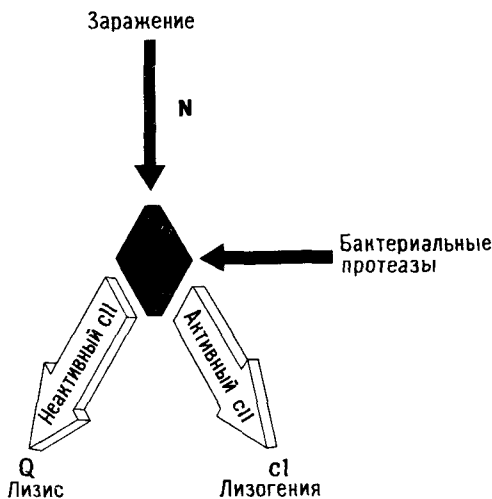


Рис. 3.10. Принятие решения о выборе пути развития (лизис или лизогения). Активность белка СII регулируется хозяйскими протеазами. Хотя белок СII на рисунке не изображен, факторы клетки-хозяина могут оказывать свое влияние через этот белок, защищающий СII от расщепления. По-видимому, другие хозяйские белки могут также регулировать трансляцию мРНК белка СII.

двух словах, решение принимается на уровне одного-единственного белка СII. Это положение проиллюстрировано на рис. 3.10. Если активность СII высока, проникший в клетки фаг лизогенизирует ее; если она низка, начинается литический цикл. После того как решение принято, все дальнейшие стадии определяются одной из двух программ.

Активность белка СII зависит от состояния окружающей среды. Согласно предполагаемой схеме (рис. 3.10), этот белок нестабилен, он может разрушаться под действием бактериальных протеаз, активность которых в свою очередь зависит от условий окружающей среды. Например, при росте в богатой среде протеазы активируются, а при голодании – наоборот, поэтому λ чаще лизогенизирует голодающие клетки. В этом есть смысл, так как в голодающих клетках не хватает компонентов, необходимых для эффективного литического роста λ .

Белок СIII фага λ также способствует установлению лизогении; его роль состоит в защите СII от деградации. Защитное действие СIII носит ограниченный характер, и при определенных условиях окружающей среды большая часть СII инактивируется, несмотря на присутствие СIII. Но если СIII нет, СII практически полностью инактивируется и фаг может размножаться только литически.

Теперь сравним результат заражения клеток, в которых активность протеаз, разрушающих белок СII, высока и низка.

● В тех клетках, где СII быстро разрушается, т.е. активность протеаз высока, репрессор не синтезируется. Идет синтез белков Q и Cro, транскрипция осуществляется согласно схеме, представленной на рис. 3.8, и происходит литический рост. Далее мы увидим, что фаг обладает механизмом для снижения количества белка Int. Этот белок синтезируется на мРНК, транскрибированной с промотора P_L .

● В тех клетках, где активность СII высока, т.е. активность протеаз низка, идет интенсивная транскрипция генов *cI* и *int* с промоторов P_{RE} и P_I соответственно (рис. 3.9). Белок Int обеспечивает интеграцию фаговой хромосомы, а репрессор связывается с операторами O_R и O_L и выключает все фаговые гены, кроме *cI*. Возникает состояние лизогении.

Если бы во втором случае белок Cro связывался с $O_R 3$ прежде, чем репрессор свяжется с $O_R 1$ и $O_R 2$, фагу было бы трудно перейти в состояние лизогении. Мы полагаем, что этого никогда не происходит при высокой активности белка СII. Скорость синтеза репрессора, стимулированного СII, достаточно высока, чтобы с учетом относительного сродства репрессора и Cro к соответствующим участкам могло установиться состояние репрессии. Тогда ген *cro* будет выключен еще до того, как образуется достаточно белка Cro, чтобы выключить P_{RM} .

Регуляция интеграции и эксцизии

В интеграции участвует только один фаговый белок Int, но обратная реакция – эксцизия – нуждается в двух белках, Int и Xis. Гены, кодирующие эти два белка, соседствуют в хромосоме, и их экспрессия в нужный момент обеспечивается двумя регуляторными механизмами. В одном из них участвует белок СII, способствующий установлению лизогении, другой представляет собой новый способ регуляции, который мы еще не обсуждали, – регуляцию активности мРНК.

Для того чтобы понять логику действия этих регуляторных механизмов, рассмотрим три возможных состояния фага. Первое – фаговая хромосома проникла в клетку и «собирается» ее лизогенизировать; второе – фаговая хромосома будет размножаться литически; третье – интегрированный профаг «собирается» ответить на индукцию, т.е. выйти из бактериальной хромосомы путем эксцизии и приступить к литическому росту.

Установление лизогении

Чтобы обеспечить интеграцию, фаг должен синтезировать как можно больше белка Int и как можно меньше белка Xis. Как

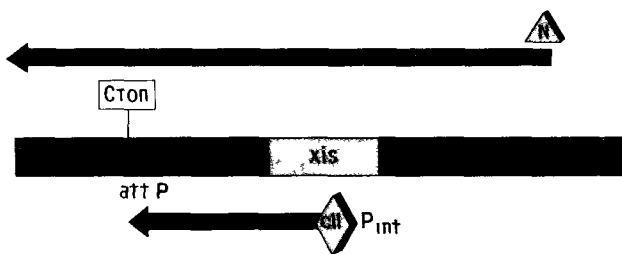


Рис 3 11 Стимуляция транскрипции гена *int* под действием белка CII. Промотор гена *int* P_{int} находится в пределах гена *xis*. Таким образом, CII стимулирует образование белка Int, но не Xis.

показано на рис. 3 11, белок CII включает транскрипцию *int*, но не *xis*. Подобно тому как он активирует P_{RE} , включая синтез репрессора, он действует одновременно и на промотор P_I . Синтез мРНК, иницированный с P_I , обрывается в конце гена *int*, и при трансляции таких мРНК образуется много белка Int. Некоторое количество Int и Xis могло бы синтезироваться на мРНК, синтезированной с P_L , но белок CII обеспечивает большой избыток Int при лизогенном пути развития.

Литический рост

В этом случае фаг синтезирует преимущественно белок Xis, а не Int, так что реплицирующиеся фаговые хромосомы не встраиваются без необходимости в хозяйскую хромосому.

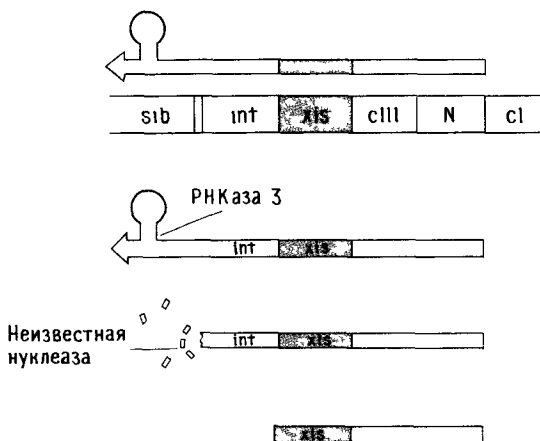


Рис 3 12 Ретрорегуляция. Участок мРНК, считанный с области *sib*, образует шпильку. Бактериальный фермент РНКазы III узнает и расщепляет эту шпильку. Затем другие бактериальные РНКазы расщепляют мРНК, начиная с участка, где произошло надразрезание.

Допустим, что белок СII при этом неактивен, и сосредоточим внимание на транскрипте, который начинается с промотора P_L и считывается с генов *int* и *xis*. Здесь мы впервые сталкиваемся с регуляцией не на уровне инициации транскрипции РНК, а на уровне стабильности мРНК.

Напомним, что под действием антитерминирующего белка N синтез мРНК, который начинается на промоторе P_L , проходит через ген *N* и продолжается на генах *int* и *xis*. Белок N переводит РНК-полимеразу в такую форму, что она пропускает сигнал конца транскрипции гена *int*, который вообще-то должен был ее остановить. Таким образом, полимеразы, модифицированная под действием N, продолжает транскрипцию и прочитывает область *sib*, как показано на рис. 3.11 и 3.12.

Далее с мРНК, несущей на конце область *sib*, происходит поразительная вещь: она постепенно разрушается, начиная с участка вблизи *sib*, и затем обратно по направлению к гену *N*. Поскольку информация, кодирующая белок Int, уничтожается раньше, чем информация о белке Xis, эта мРНК успевает «произвести» больше белка Xis, чем Int. Такой способ регуляции называют ретрорегуляцией.

Индукция

В третьем случае, при индукции лизогена, фаг должен образовывать *оба* белка, Int и Xis, чтобы могло произойти его вырезание из хромосомы хозяина. Но поскольку речь идет о начале литического роста, мы не можем рассчитывать на

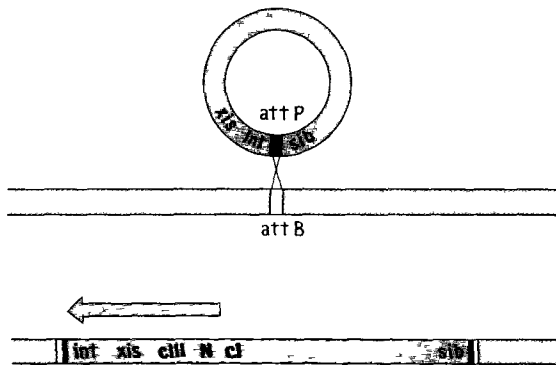


Рис 3.13 Интеграция и расположение генов фага λ . В результате интеграции, т.е. рекомбинации по участку *att*, участок *sib* оказывается далеко отстоящим от гена *int*.

белок Σ , чтобы обеспечить синтез *Int*. Проблема решается следующим образом: в результате транскрипции с промотора P_L опять-таки образуется мРНК, кодирующая *Int* и *Xis*, но в этом случае область *sib* на конце мРНК отсутствует. Как видно на рис. 3.13, в результате процесса интеграции фаговой хромосомы область *sib* оказывается далеко отстоящей от *int*, так что мРНК, инициированная на P_L , не содержит области *sib*. Следовательно, с этой мРНК транслируются и *Int*, и *Xis*.

Другие фаги

Фаг λ входит в группу фагов, которые инфицируют клетки *E. coli* и могут лизогенизировать их. Последовательность ДНК некоторых из этих фагов несколько не похожа на последовательность λ . Тем не менее общие принципы организации их генов и механизмы регуляции очень близки.

Таким образом, карта, приведенная на рис. 3.1, приложима ко многим фагам, но с небольшими модификациями. Например, все эти фаги различаются по последовательности сайта *att* и потому внедряются в разные места бактериальной хромосомы. В каждом случае продукты генов *int* и *xis* предназначены для катализа строго определенных процессов интеграции и эксцизии. Еще один пример индивидуальных различий: Q-подобные белки разных фагов обладают антитерминирующей активностью только по отношению к своим собственным небольшим РНК, считанным со своих хромосом, и не работают в качестве антитерминаторов при транскрипции λ . Наконец, все эти фаги используют свои собственные репрессоры и белки Σ о, действующие на свои операторы, но не на операторы λ .

Если говорить об общих принципах организации, которым посвящена эта глава, или о деталях молекулярных механизмов, как в гл. 1 и 2, то становится очевидным, что в целом регуляторные механизмы одинаковы, хотя специфические последовательности, которые в них используются, различны. Разные фаги эволюционируют совместно, обмениваясь время от времени участками своих хромосом с помощью генетической рекомбинации. Например, если область *att-xis-int* фага λ заменить соответствующей ДНК другого фага, то мы получим фаг, идентичный λ , но встраивающийся в другое место бактериальной хромосомы.

Для осуществления такого тасования целых комплексов информационных единиц (генов) необходимо, чтобы последовательности ДНК, являющиеся местами действия регуляторных белков, лежали поблизости от генов, кодирующих сами эти белки. Так, репрессор и белок Σ о связываются с операторами, фланкирующими ген *cI*; белки Σ и Σ р действуют на область начала репликации (*Ori*), которая лежит внутри са-

мого гена *O*; продукты генов *int* и *xis* действуют на *att*: *Q* действует на участок, расположенный вблизи гена *Q*; наконец, белок *N* узнает участки *Nut*, лежащие вблизи гена *N*.

SOS-ответ

Индукция фага λ – лишь один из многих ответов бактерии на облучение УФ-светом. При этом включается в общей сложности 10–20 бактериальных генов, и по крайней мере некоторые из них помогают бактерии выжить. Эти гены в совокупности называют SOS-системой, а их активацию – SOS-ответом клетки.

Механизм индукции бактериальных генов под действием УФ-света такой же, как при индукции роста фага в лизогенных клетках. Напомним, что УФ-облучение вызывает повреждения ДНК (гл. 1). В результате белок *Rec A*, который обычно способствует рекомбинации между молекулами ДНК, превращается в особую протеазу: она расщепляет λ -репрессор, запуская тем самым индукцию (рис. 1.21). *Rec A* расщепляет еще по крайней мере один репрессор, белок хозяйской клетки *Lex A*.

Lex A сходен с репрессором λ и по структуре, и по функции. Мономер *Lex A* состоит из двух доменов: amino-концевого, узнающего ДНК, и карбокси-концевого, который удерживает субъединицы вместе в составе димера. Белок *Lex A* подавляет активность ряда генов, продукты которых помогают бактерии выжить при облучении (рис. 3.14). При УФ-облучении *Lex A* инактивируется под действием *Rec A*, и эти гены включаются. *Rec A* расщепляет *Lex A* точно так же, как он расщепляет репрессор, по строго определенной связи в цепочке аминокислот, соединяющей два домена.

Репрессор λ , подобно репрессорам других фагов, лизогенизирующих *E. coli*, использует SOS-ответ клетки. Репрессированный фаг «чувствует», что хозяйская клетка повреждена, и немедленно начинает литический цикл.

SOS-система включается не только под действием УФ-облучения. Как правило, ее может запустить любой канцероген, если он соответствующим образом активирован. Бензпирен – одно из соединений, вызывающих образование опухолей у животных. Сам по себе бензпирен инертен, но после модификации под действием фермента, который находится в печени животных, он реагирует с ДНК и вызывает в ней повреждения. Если бензпирен добавить непосредственно в среду, он не оказывает никакого действия на бактерии, но если его вначале модифицировать с помощью ферментов печени, он эффективно индуцирует SOS-ответ.

Способность того или иного соединения индуцировать SOS-ответ коррелирует с его способностью вызывать образо-

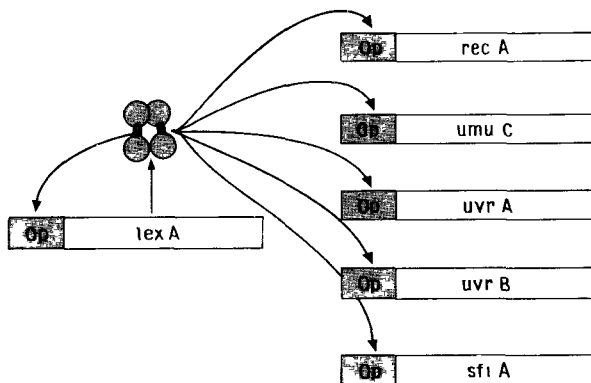


Рис 3.14 Действие белка LexA и SOS-ответ. Показаны некоторые гены, подавляемые белком LexA. Гены *uvrA* и *uvrB* кодируют белки, ответственные за репарацию поврежденной УФ-облучением ДНК. Для образования мутантных бактерий в ответ на УФ-облучение по непонятным причинам необходим белок UmuC. Op – операторы *LexA*, которые располагаются рядом с промоторами каждого из указанных генов.

вание опухолей у животных; и хотя споры по поводу правомочности такой корреляции продолжаются, бактерии используют в качестве чувствительных детекторов при проверке веществ на канцерогенность. Применяют два основных теста: индукцию роста фага в лизогенных бактериях и появление мутантов в нелизогенных культурах. Последний подход лежит в основе известного теста Эймса на канцерогенность. В обоих случаях первичное событие, происходящее сразу после повреждения ДНК, – индукция экспрессии генов. Для индукции фага необходимо, чтобы Rec A активировал фаговые гены, расщепив репрессор; для мутагенеза необходимо, чтобы Rec A активировал бактериальные гены, расщепив Lex A.

Пути развития фага λ и развитие эукариотических клеток: возможные аналогии

Мы рассматриваем альтернативные способы экспрессии генов как простейшую модель развития. Теперь проведем три аналогии между этими процессами и развитием эукариотического организма из оплодотворенного яйца. Это позволит нам подытожить основные черты регуляции генов фага λ и увидеть их в новом свете.

Регуляторные гены

При изучении высших организмов были обнаружены гены, роль которых состоит в регуляции экспрессии других генов. С

одним из наиболее поразительных примеров такого рода мы встречаемся у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Этот организм развивается из оплодотворенного яйца в три этапа. Вначале формируется эмбрион, затем личинка и наконец взрослая муха. Организм личинки и взрослой мухи состоит примерно из 15 сегментов, которые образуют голову, грудь и брюшко. Каждый сегмент, особенно если он относится к грудным или брюшным, легко отличить от остальных сегментов и у личинки, и у взрослой мухи.

Чтобы продемонстрировать, как регулируется дифференциация сегментов, рассмотрим два соседних грудных сегмента, T2 и T3. Продукт одного гена, *Ubx*, экспрессируется в сегменте T3, но не в T2. Если этот ген не функционирует в T3, последний развивается так же, как T2; если он экспрессируется в обоих сегментах, то сегмент T2 развивается так же, как T3. Итак, формирование продукта гена *Ubx* в ходе развития обуславливает формирование сегмента T3; в противном случае образуется T2.

Ген *Ubx* относится к группе гомеозисных генов, которые детерминируют дифференцировку группы клеток. Мы предполагаем, что на ранних стадиях развития в каждом сегменте включается свой особый набор гомеозисных генов. Эти гены остаются включенными на протяжении всей жизни взрослого организма и поддерживают особую схему экспрессии генов, специфичную для данного сегмента. Пока не доказано, что каждый гомеозисный белок является непосредственным регулятором генов, но многие исследователи считают, что это весьма вероятно.

Возвращаясь к фагу λ , можно утверждать, что *cI* аналогичен гомеозисным генам. Чтобы проиллюстрировать это положение, рассмотрим гипотетический древний фаг λ , у которого не было гена *cI*. Этот фаг должен был бы хорошо размножаться, но только литически; другими словами, он мог бы осуществлять только одну программу экспрессии генов. Введение гена *cI* (вместе с генами *cII* и *cIII*) позволяет фагу переходить к другому способу экспрессии генов. Напомним, что ген *cI* включается на ранней стадии установления лизогении под действием *cII*, при участии *cIII*. После этого экспрессия *cI* самоподдерживается на постоянном уровне, а белок *C1* в свою очередь обеспечивает характерную для лизогении экспрессию генов. Еще один ген λ , функция которого аналогична функции гомеозисных генов, — *Q*; как и ген *cI*, он необходим только для одного из альтернативных путей развития λ .

Мало того, что гены *cI* и *Q* необходимы только для одного из путей развития; их продукты, кроме того, во многом определяют выбор этого пути. Так, если ввести белок *Q* в лизогенную клетку, произойдет включение поздних генов и лизис. Если в клетку, где начинается литический цикл фага, ввести репрессор, рост фага будет подавлен. В отличие от этих

генов ген N фага λ необходим и для литического роста фага, и для установления лизогении. Поскольку в отсутствие гена N фаг не будет развиваться ни по одному из возможных путей, мы бы не отнесли ген N к гомеозисным генам.

Говоря о процессах развития, иногда полезно провести различие между «принятием решения» и действительной дифференциацией клеток. Говоря так, мы подразумеваем, что клетки, которые выглядят одинаковыми на ранних стадиях развития, тем не менее впоследствии дифференцируются и, находясь в одинаковых на первый взгляд условиях, дают начало разным типам клеток. Иными словами, они «приняли решение» (коммитированы) пойти по определенному пути дифференцировки после получения соответствующего стимула.

Одна из форм подобного «принятия решения» – активация некоторых генов, возможно регуляторных. Такой набор активированных генов может в дальнейшем определить ответ на внешний сигнал, а окончательная дифференцировка может быть результатом последующих изменений экспрессии генов.

Если продолжить аналогию, то лизогенная по фагу λ клетка неотличима от неинфицированной бактерии, но только первая из них коммитирована, т. е., «приняла решение» начать литический цикл и высвободить фаговые частицы после поступления индуцирующего сигнала. Правда, в лизогенной клетке имеются гены, которых нет в обычной клетке, но нетрудно представить себе аналогичный способ «принятия решения» с использованием только дифференциальной экспрессии генов. Возьмем простой пример: регуляторные белки клетки могут включить ген, кодирующий рецептор гормона. Такая клетка в отличие от соседней, в которой ген рецептора гормона молчит, будет отвечать на гормональное воздействие, например, новыми изменениями в общей картине экспрессии генов.

Переключатели

На разных стадиях развития высших организмов сигналы, поступающие из окружающей среды, запускают тот или иной путь экспрессии генов. Проиллюстрируем это положение следующим примером. Рассмотрим в общих чертах эмбрион дрозофилы на стадии ранней бластулы. Яйцо еще не поделилось, но деление ядра уже произошло и около 4000 ядер расположились у поверхности яйца. Вскоре эти ядра образуют клетки, из которых сформируются различные части личинки.

Каким образом ядра на этой ранней стадии получают сигнал о включении набора генов, необходимых для выбора пути развития? Считается, что для яиц характерно асимметричное, возможно градиентное, распределение молекул, которые и запускают экспрессию генов. Поэтому условия

окружающей среды для ядер, расположенных в передней части яйца, отличаются от таковых для ядер в задней его части. Точно так же предполагается, что концентрации некоторых веществ в вентральной и дорсальной сторонах яйца различаются. Каждое клеточное ядро должно отозваться на свое положение в яйце, «почувствовать» концентрации этих агентов и тем самым направить экспрессию генов по определенному пути.

Аналогично считается, что на поздних стадиях развития мухи клетки принимают новые решения, касающиеся экспрессии генов, на основании их положения в развивающемся эмбрионе. Можно представить, что в этом случае клетки определяют свое положение, используя концентрацию агентов, которые продуцируют другие клетки, и включают или выключают нужные гены.

Возвращаясь к фагу λ , вспомним, что в его жизненном цикле есть две стадии, когда внеклеточные сигналы влияют на экспрессию генов. В обоих случаях главный объект воздействия — ген *cI*, но воспринимают и передают сигнал разные белки. В первом случае, при индукции лизогена УФ-облучением, белок Rec A инактивирует репрессор. Во втором случае условия роста клеток в момент заражения влияют на активность белка CII, который должен включить транскрипцию гена *cI* для установления лизогении. Другими словами, мы могли бы сказать, что в одном случае нарушается *поддержание* дифференцированного состояния, а в другом затронуто его *установление*.

В обоих случаях влияния внеклеточных факторов на фаг λ он использует внеклеточные сигналы, чтобы принять решение, какой путь развития избрать. Мы могли бы сказать, что положение двухпозиционного переключателя генов зависит от внеклеточных условий. Переключение λ на путь индукции, механизм которого мы понимаем лучше всего, происходит таким образом, что сравнительно небольшие изменения концентрации репрессора определяют, произойдет ли индукция лизогена. Другими словами, разумно предположить, что разница в концентрации какого-либо регуляторного белка всего в 5–10 раз сможет перевести переключатель генов дрозофилы в другое положение, если только он подобен механизму переключения фага λ . Переключатель такой конструкции практически никогда не срабатывает случайно. Так, если бы нам пришлось следить за потомством одной клетки, лизогенной по фагу λ , проверяя лишь одну из дочерних клеток в каждом поколении, нам пришлось бы ждать 5–10 лет, прежде чем мы обнаружили бы лизис клетки в отсутствие индуцирующего сигнала.

Способы экспрессии генов

Мы полагаем, что в ходе развития высший организм экспрессирует гены во множестве различных комбинаций. Определенный ген может, например, включаться на разных стадиях развития и в различных тканях, будучи во всех случаях компонентом разных наборов активированных генов. Для этого необходимо, чтобы отдельные гены подчинялись множественным регуляторным механизмам.

Например, ген алкогольдегидрогеназы дрожефили экспрессируется в одной группе тканей у личинки и в другой группе тканей, отчасти перекрывающейся с первой, у взрослой мухи. В этом случае мы частично понимаем механизмы регуляции. Транскрипция этого гена контролируется двумя промоторами, которые управляются разными регуляторными механизмами. В эмбрионе активны оба промотора, но в личинке активен только один, а у взрослой мухи – только другой.

Изучая фаг λ , мы видели, что некоторые его гены экспрессируются в составе той или иной группы генов в зависимости от стадии роста. Например, ген *cI* в процессе установления лизогении работает вместе с геном *int*, а в стабильном лизогене *cI* работает, а *int* – нет. В этих двух состояниях ген *cI* транскрибируется с различных промоторов: в процессе установления лизогении – с промотора, активируемого белком CII, а при лизогении – с промотора лизогена, активируемого репрессором.

Обращаясь к соседствующим генам *int* и *xis*, вспомним, что для них имеются три способа экспрессии: во время лизогенизации экспрессируется преимущественно *int*, во время литического роста – преимущественно *xis*, а при индукции происходит совместная экспрессия *int* и *xis*. Эти три способа реализуются с помощью двух промоторов, с которых транскрибируется *int*, а также путем «ретрорегуляции» на уровне мРНК гена *int*.

Следующий пример относится к физиологии бактерий и показывает, сколь существенным может быть результат совмещения двух способов регуляции одного гена. Ведь в этом случае одно и то же соединение в зависимости от внешних условий активирует две разные группы генов.

Гены лактозного (*lac*) и галактозного (*gal*) оперонов кодируют ферменты, отвечающие за метаболизм сахаров лактозы и галактозы. Каждая группа генов инактивируется собственным репрессором. В присутствии лактозы в среде *lac*-репрессор удаляется с ДНК, подобно этому добавление в среду галактозы инактивирует *gal*-репрессор.

Эти гены, как и многие другие гены *E. coli*, активируются регуляторным белком БАК. БАК связывается с ДНК и активирует транскрипцию только в присутствии циклического

AMP (сAMP) и только если соответствующий репрессор удален с ДНК. Таким образом, низкомолекулярное соединение сAMP активирует в присутствии лактозы *lac*-гены, а в присутствии галактозы – *gal*-гены.

сAMP является частью еще одного регуляторного механизма. Концентрация сAMP регулируется глюкозой. В присутствии глюкозы синтез сAMP подавлен, и ни гены *lac*, ни гены *gal* не могут быть активированы. В результате если у бактерии есть выбор в утилизации различных сахаров, она предпочитает использовать глюкозу, а не лактозу или галактозу.

Механизмы регуляции

Из того факта, что между размножением фага λ и развитием эукариотических организмов можно провести некоторую параллель, не обязательно следует, что в основе развития всегда лежат одни и те же механизмы. На самом деле нам известны механизмы регуляции генов, которые не встречаются у λ , и в будущем, несомненно, будут открыты новые механизмы. В приложении 3, завершающем эту книгу, высказаны более детальные предположения относительно возможных аналогий между механизмами регуляции генов фага λ и высших организмов.

Литература: обзоры

Указанные ниже обзоры опубликованы в книге Hendrix R W, Roberts J W, Stahl F W, Weisberg R (eds) *Lambda II*. New York, Cold Spring Harbor, 1983.

- 1 Campbell A, Botstein D. Evolution of the lambdoid phages, pp 365–381, 1983.
- 2 Echols H. Control of integration and excision, pp 75–93, 1983.
- 3 Friedman D, Gottesman M. Lytic mode of λ development, pp 21–53, 1983.
- 4 Hershey A D, Dove W. Introduction to λ , pp 3–13, 1983.
- 5 Weisberg R, Landy A. Site-specific recombination in phage λ , pp 211–251, 1983.
- 6 Wulff D, Rosenberg M. Establishment of repressor synthesis, pp 53–75, 1983.

В следующих обзорах обсуждаются различные аспекты регуляции генов в ходе развития дрозифиты. Статьи о регуляции других эукариотических генов приведены в списке литературы к приложению 3.

- 7 Garcia-Bellido A, Lawrence P A, Morata G. Compartments in animal development, *Sci Amer*, **241**, 102–110 (1979).
- 8 Gehring W J. The molecular basis of development, *Sci Amer*, **253**, 153–162 (1985).
- 9 Kauffman S, Shymko R, Trabert K. Control of sequential compartment formation in *Drosophila*, *Science*, **199**, 259–270 (1978).
- 10 Lewis E B. Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex. In *Embryonic Development: Genes and Cells*, ed M Burger, New York, Liss, pp 269–288, 1982.

Глава 4

Откуда мы это знаем?

Ключевые эксперименты

В первых нескольких разделах этой главы рассмотрены важнейшие эксперименты, которые послужили основой для существующих представлений о механизмах переключения генов. Далее описаны некоторые эксперименты, иллюстрирующие суть многих рисунков гл. 1 и 2. Более подробное изложение экспериментальных данных можно найти в статьях, указанных в списке литературы в конце этой главы, а также в работах, которые цитируются в этих статьях. В настоящей главе не приведены данные, на которых основаны концепции, изложенные в гл. 3. Ссылки на них читатель найдет в обзорах, указанных в списке литературы.

Гипотеза о существовании репрессора

Мысль о том, что фаг λ кодирует репрессор—молекулу, которая выключает все остальные фаговые гены, была сформулирована французскими учеными Ф. Жакобом и Ж. Моно и их коллегами в конце 50-х—начале 60-х годов. Рассуждения этих исследователей основывались прежде всего на генетических данных, начиная с некоторых простых наблюдений, касающихся роста фага. В данном разделе описаны три группы таких наблюдений и дано их объяснение, основанное на гипотезе о существовании репрессора.

Прозрачные и вирулентные мутанты

Наблюдения

Для наблюдения за ростом фага λ поступают следующим образом. Смешивают несколько фаговых частиц примерно с миллионом бактериальных клеток и выливают смесь в чашку с агаром. В процессе роста бактерии образуют газон по всей поверхности агара. Но одновременно с бактериями растут и фаги, и каждая фаговая частица приводит к формированию бляшки, т.е. дырки, в бактериальном газоне (рис. 4.1).

Бляшки, образованные фагами λ дикого типа, мутные

(непрозрачные), потому что, хотя по мере увеличения бляшки многие зараженные бактерии лизируются, некоторые продолжают расти на поверхности самой бляшки. Если эти бактерии, выросшие в середине бляшки, переколоты и выращены, то обнаружится, что они устойчивы к заражению другими фагами λ . Такие устойчивые клетки лизогенны: при облучении УФ-светом они лизируются и дают новое фаговое потомство.

Однако иногда можно наблюдать появление прозрачных (не мутных) бляшек. Каждая прозрачная бляшка образуется под действием мутантного фага λ , у которого нарушена способность лизогенизировать клетки, но в остальном он растет нормально. Прозрачная бляшка представляет собой зону сплошного лизиса и не содержит лизогенных бактерий.

В большинстве таких прозрачных мутантов поврежден один из трех генов: *cI*, *cII* или *cIII*. Можно выделить редкие клетки, лизогенизированные мутантными по генам *cII* или *cIII* фагами. Изолированные лизогены такого типа стабильны, устойчивы к фагу и индуцируются при УФ-облучении. Однако получить лизогенные клетки, содержащие фаг, мутантный по *cI*, невозможно.

Мутанты фага λ по *cI* не могут лизогенизировать клетки, при этом, подобно другим прозрачным мутантам и фагам дикого типа, они не способны лизировать клетки, лизогенные по фагу λ . Еще один мутант фага λ , который обозначается λ *vir* (от англ. *virulent* – вирулентный), растет как на лизогенных, так и на нелизогенных бактериях. Такие мутанты, образующие прозрачные бляшки равно на лизогенных и нелизогенных клетках, возникают в популяции гораздо реже, чем обычные мутанты с прозрачными бляшками. Этот факт позволяет

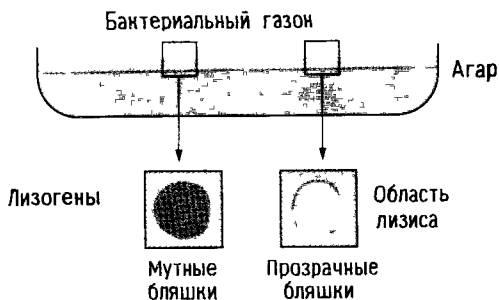


Рис 4.1. Бляшки, которые образует растущий фаг λ . Фаг смешивают с бактериями и смесь выливают на чашку с агаром. Фаг вызывает лизис зараженной клетки, высвободившееся фаговое потомство заражает близлежащие клетки, и этот процесс повторяется многократно. Лизогенные и, следовательно, иммунные клетки растут в центре бляшек, образованных фагом λ дикого типа, поэтому бляшки мутные.

предположить, что мутант λvir содержит более одной мутации.

Объяснение

В лизогенных клетках продукт гена cI – репрессор – выключает все фаговые гены, кроме cI , в том числе гены, необходимые для литического роста фага. Гены cII и $cIII$ участвуют в установлении лизогенного состояния на ранней стадии заражения, но не нужны для поддержания состояния лизогении. Как мы уже знаем, белок cII при участии белка $cIII$ включает транскрипцию гена cI . Фаг λvir содержит мутации в местах связывания репрессора, которые теперь называются операторами; репрессор не может связаться с такими мутантными операторами, и потому λvir вызывает литическую инфекцию даже в присутствии репрессора. Чтобы фаг λ стал вирулентным, в нем, как нам теперь известно, должны возникнуть мутации в двух операторах, O_L и O_R .

Иммунность и гетероиммунность

Наблюдения

Фаг λ – всего лишь один из представителей обширной группы фагов, которые инфицируют *E. coli* и могут лизогенизировать ее. Типичный представитель λ -подобных фагов – фаг 434. При росте на *E. coli* он, как и фаг λ , образует мутные бляшки; для него известны вирулентные мутанты и мутанты с прозрачными бляшками. Удивительное свойство клеток, лизогенных по фагу 434, состоит в том, что они устойчивы к этому фагу, но чувствительны к фагу λ ; рост фага λ на клетках, лизогенных по фагу 434, практически неотличим от роста на нелизогенных клетках. Точно так же клетки, лизогенные по фагу λ , чувствительны к фагу 434. Такие взаимоотношения между фагами λ и 434 называются гетероиммунностью.

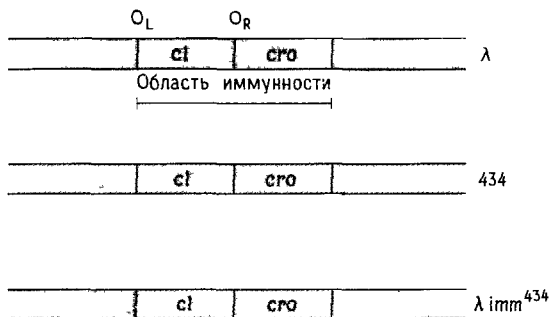


Рис. 4.2. Область иммунности. Размер области иммунности фагов λ и 434 составляет всего несколько процентов суммарной длины фаговых хромосом.

Таблица 4.1. Бляшки, которые образуют различные фаги при заражении трех штаммов бактерий. Условия выращивания указаны на рис. 4.1

	λ	λcI	λvir	434	λimm^{434}
<i>E. coli</i> K	М	П	П	М	М
K (λ)	-	-	П	М	М
K (λimm^{434})	М	П	П	—	—

«п» означает, что бляшки прозрачные, «м» — мутные; прочерк — бляшки не образуются. K (λ) — штамм *E. coli* K, лизогенный по фагу λ . Результаты эксперимента с клетками K(434) будут такими же, как и с K (λimm^{434}).

Эксперименты по генетической рекомбинации показали, что особенности иммунитета каждого фага определяются небольшим участком фаговой хромосомы, который называется областью иммунитета. Как видно из рис. 4.2, в эту область входят гены *cI* и *cro* и участки, на которые действуют продукты этих генов.

Гибридная хромосома, которая содержит все гены фага λ , кроме области иммунитета, замененной на соответствующую область фага 434, обладает иммунитетом, характерной для фага 434. Поэтому такие фаги, обозначаемые λimm^{434} или 434 hu, дают лизогены, устойчивые к фагам 434, но не к фагам λ , в то время как сами гибриды могут расти на лизогенах по фагу λ , но не по фагу 434. В табл. 4.1 суммированы данные о росте различных фагов на разных лизогенах.

Объяснение

Фаг 434 кодирует репрессор, специфичность которого отличается от специфичности репрессора фага λ ; он связывается с операторами фага 434, но не λ , репрессор же фага λ , напротив, не может узнавать операторы фага 434. Область иммунитета, выявленная в экспериментах с гибридными фагами λ -434, включает ген *cI* и, как мы теперь знаем, ген *cro*, а также левые и правые операторы и промоторы. Тот факт, что гены *cII* и *cIII* не входят в область иммунитета, означает, что белки *cII* и *cIII* фага λ способны включать ген *cI* фага 434, и в свою очередь белки *cII* и *cIII* фага 434 могут включать ген *cI* λ .

Асимметрия бактериальной конъюгации

Наблюдения

Лизогены по фагу λ , подобно лизогенам по другим фагам, в экспериментах по конъюгации бактерий ведут себя асимметричным образом. При конъюгации бактерий мужские клетки *E. coli* присоединяются к женским клеткам и вводят в них свою

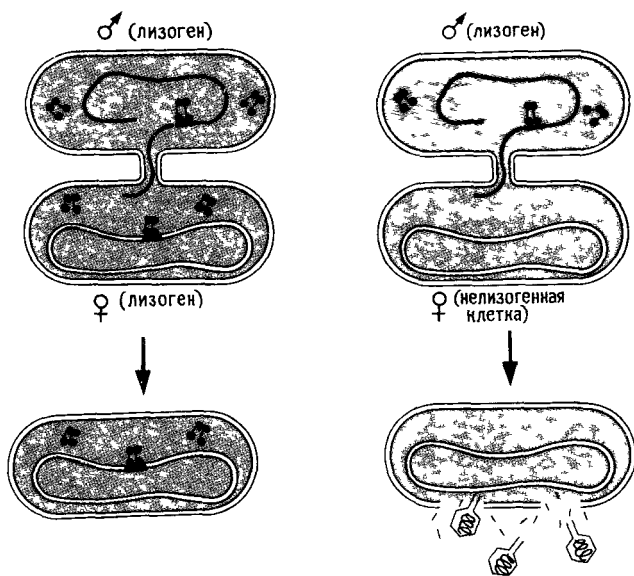


Рис 4.3 Зиготная индукция. При конъюгации бактерий гены донорной клетки входят в реципиентную клетку в определенном порядке. Различные донорные штаммы начинают перенос кольцевой хромосомы *E. coli* с разных ее участков. Белки, в том числе репрессор λ , не переносятся в реципиентную клетку при конъюгации.

ДНК. Если женская клетка или обе родительские клетки лизогенны, конъюгация протекает нормально и в результате образуется зигота. Зигота представляет собой материнскую клетку, несущую некоторые дополнительные гены отцовской клетки. Однако если мужская клетка лизогенна, а женская – нет или если женская клетка лизогенна по фагу с другим типом иммунитета, многие женские клетки лизируются, давая фаговое потомство. На рис. 4.3 схематически изображен этот процесс, который называется зиготной индукцией.

Объяснение

Как следует из рис. 4.3, если отцовская клетка лизогенна, а материнская – нет, то репрессор содержится в цитоплазме только первой из них. В женскую клетку переносится лишь ДНК без всяких других клеточных компонентов. Фаговая ДНК, интегрированная в хозяйскую хромосому, попадает в женскую клетку, лишенную репрессора, и в результате происходит активация фаговых генов.

Оригинальные эксперименты по вирулентности, иммунности и зиготной индукции были описаны в работах [3, 7, 34, 35], указанных в списке в конце главы.

Проблема репрессора в начале 60-х гг. [3, 8]

Параллельно с ранними экспериментами по регуляции генов фага λ был проведен ряд важных экспериментов по регуляции бактериальных ферментов, участвующих в метаболизме сахара лактозы. Рис. 4.4 иллюстрирует идею о том, что продукт гена *lacI* представляет собой репрессор (*lac*-репрессор), который узнает *lac*-оператор и выключает несколько генов. Один из этих генов, *lacZ*, кодирует β -галактозидазу – фермент, который расщепляет лактозу. Было выдвинуто предположение, что сама лактоза или какой-то продукт ее метаболизма связывается с *lac*-репрессором и инактивирует его, включая таким образом гены *lac*-оперона.

В начале 60-х гг. идеи, лежащие в основе концепции репрессора, могли оспариваться. Например, можно было допустить (и такие соображения высказывались), что продукты генов *cI* и *lacI* представляют собой не репрессоры, как предполагала гипотеза, а ферменты и катализируют другие реакции, в результате которых и образуется «истинный» репрессор. Генетические эксперименты сами по себе не могли опровергнуть это предположение, равно как не могли и разрешить споры относительно молекулярной природы репрессора. С самого начала предполагалось, что репрессоры связываются непо-

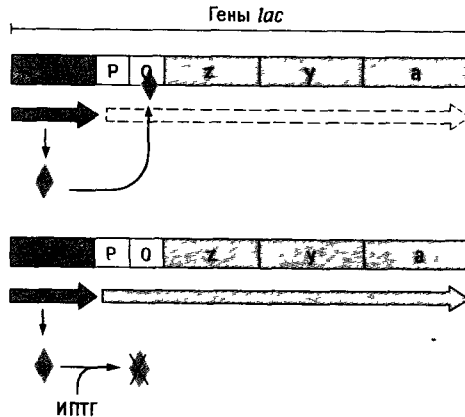


Рис 4.4 Гены *lac*-оперона *lac*-Репрессор выключает три гена, которые считываются в виде одной молекулы РНК и кодируют ферменты метаболизма лактозы Соединение ИПТГ (изопропилтио- β -галактозид) напоминает лактозу и индуцирует все три гена одновременно При связывании с индуктором репрессор не разрушается, а модифицируется таким образом, что теряет сродство к оператору *lac*-Репрессор осуществляет только негативную регуляцию, и кодирующий его ген *lacI* все время транскрибируется с малой эффективностью На рисунке не изображен БАК, который помогает полимеразе связаться с промотором и начать транскрипцию в присутствии cAMP, если свободен *lac*-промотор

средственно с операторными участками ДНК и выключают транскрипцию генов. Но высказывались и другие, не менее правдоподобные идеи. Например, оператор мог транскрибироваться как часть молекулы мРНК, а затем, в соответствии с одной из гипотез, репрессор должен был связаться с мРНК и выключить ее трансляцию.

Стало ясно, что необходимо выделить продукты регуляторных генов. Исследователи надеялись, что особые свойства этих продуктов в экспериментах *in vitro* позволят выяснить механизм их действия. В 1966–1967 гг. удалось выделить *lac*- и λ -репрессоры. Ниже мы вкратце остановимся на экспериментах, посвященных λ -репрессору, чтобы показать, насколько плодотворным может быть сочетание генетических и биохимических подходов.

Выделение репрессора и его связывание с ДНК [53, 54]

В основе метода, который был первоначально использован для выделения λ -репрессора, лежали следующие соображения: репрессор присутствует в клетке в ничтожных количествах (несколько сотен молекул на клетку по сравнению с десятками тысяч молекул обычного фермента); никакого способа определения его активности не существует; его молекулярная природа неизвестна, если не считать того, что он хотя бы отчасти является соединением белковой природы.

Идея опыта, проиллюстрированная на рис. 4.5, состояла в том, чтобы заразить две разные культуры клеток *E. coli* двумя штаммами фага λ . Эти штаммы различались только тем, что один из них мог образовывать репрессор (cI^+), а другой (cI^-) – нет. Клетки являлись лизогенами по фагу λ и, следовательно, содержали λ -репрессор, который должен был выключить все гены инфицирующего клетки фага, за исключением гена *cI*. Кроме того, клетки перед заражением облучили большой дозой УФ-света, чтобы внести повреждения в ДНК клетки-хозяина и тем самым подавить синтез клеточных белков. Репрессор, который присутствовал в облученных клетках, представлял собой мутантную форму, которая в отличие от репрессора дикого типа не инактивировалась при облучении.

После этого, как предполагалось, одна из зараженных культур клеток должна была бы синтезировать только один новый белок, λ -репрессор, а другая, инфицированная мутантом cI^- , не должна была синтезировать ни одного нового белка. Действительно, когда одну из культур поместили ^3H -лейцином, а другую – ^{14}C -лейцином, затем клетки смешали,

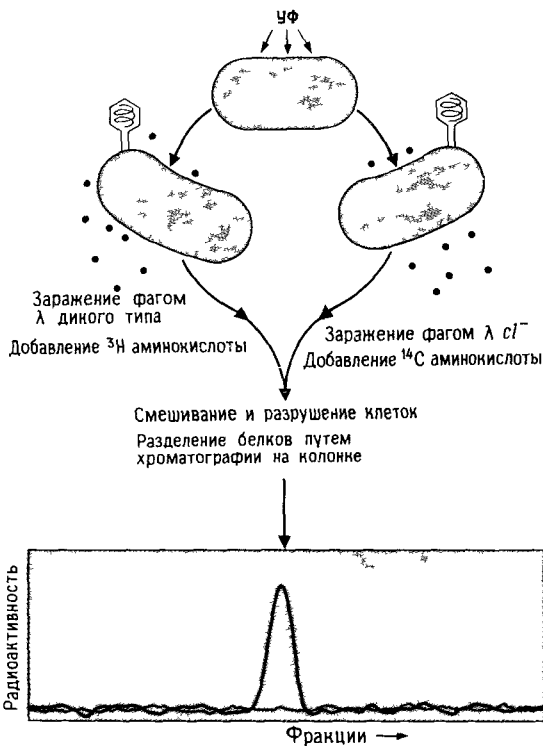


Рис. 4.5 Выделение λ репрессора. В действительности λ репрессор был изодто выделен с помощью избирательного мечения репрессора присутствующего в клетке в ничтожном количестве. Скорость синтеза репрессора по сравнению с другими к источными белками была увеличена с помощью УФ облучения как это описано в тексте. Мутант cI^- был использован для того чтобы подтвердить что меченый белок действительно является продуктом гена cI .

разрушили их и проанализировали содержимое, то обнаружили лишь один белок, меченный ^3H , но не ^{14}C . Репрессор составлял незначительную часть конечной смеси белков, но за его судьбой можно было следить благодаря его специфической радиоактивности. Что же делал этот белок – продукт гена cI ? С помощью единственного эксперимента было показано, что он специфически связывался с коротким участком двухцепочечной ДНК фага λ , содержащей соответствующие операторы. Радиоактивно меченный продукт гена cI смешали с ДНК фага λ в одной пробирке и с ДНК $\lambda\text{int}^{4,34}$ в другой и смеси по отдельности центрифугировали в сахарозном градиенте (рис. 4.6). В этих условиях молекулы, близкие по размеру к ДНК фага λ , оседают гораздо быстрее, чем свободный репрессор, и эти два компонента легко разделить. Оказалось, что

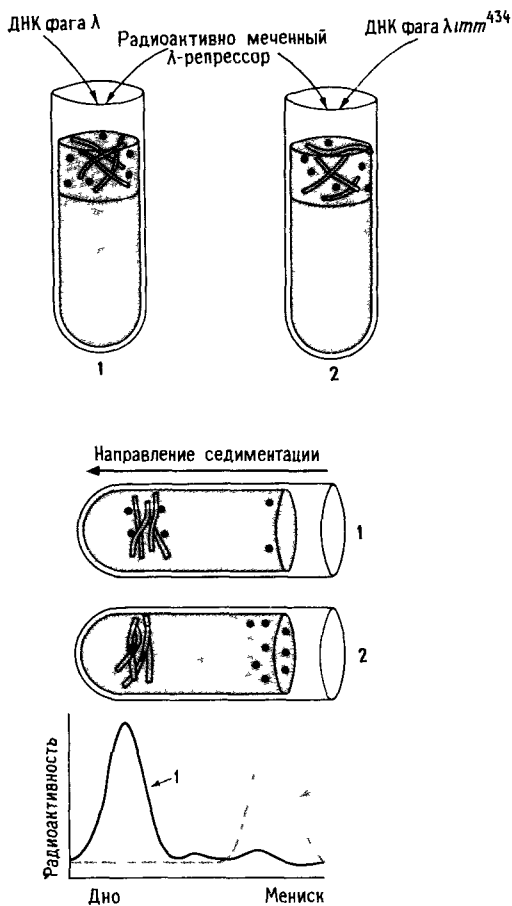


Рис 4.6 Специфическое связывание λ -репрессора с ДНК фага λ . Этот эксперимент показывает, что λ -репрессор связывается с ДНК фага λ , но не с ДНК λttt^{434} . Аналогичным образом репрессор фага 434 связывается с ДНК фага λttt^{434} , но не с ДНК фага λ . Поскольку эти две ДНК различаются только областью иммунитета, репрессоры связываются с участками, расположенными именно в этих областях. Как показали дополнительные эксперименты, ДНК, выделенная из фага λ_{vir} , связывает λ -репрессор гораздо слабее, чем ДНК фага λ дикого типа. Это подтверждает, что репрессор связывается с операторами фага λ , выявленными генетическими методами.

меченый белок движется вместе с быстро седиментирующей ДНК фага λ , но не с ДНК λttt^{434} , которая седиментирует так же быстро. Напомним, что ДНК λttt^{434} отличается от ДНК фага λ только короткой областью хромосомы, несущей гены *cI*, *cro* и операторы (рис. 4.2). Результат этого эксперимента с убедительностью показывал, что ген *cI* кодирует репрессор,

который специфически связывается непосредственно с оператором. Кроме того, если ДНК подвергали денатурации, т.е. разделяли цепи двойной спирали нагреванием, совместной седиментации белка и ДНК не происходило. Следовательно, оператор должен представлять собой двухцепочечную ДНК.

Получение большого количества репрессора [12, 15, 56]

Чтобы изучать структуру репрессора, необходимо было прежде всего сконструировать штаммы *E. coli*, образующие его в большом количестве, чтобы репрессор можно было легко выделять. Это стало возможным с появлением рекомбинантных ДНК. Ген *cI* был клонирован, т.е. вырезан из хромосомы фага λ с помощью разрезающих ДНК ферментов (ферментов рестрикции), и встроен в плазмиду. Плазмида — это кольцевая молекула ДНК, гораздо меньшая, чем хромосома *E. coli*, и представленная в каждой клетке в данном случае в количестве 25–50 копий. Плазмида реплицируется независимо от хозяйской ДНК, ее можно выделить из клеток, модифицировать и ввести в другие клетки.

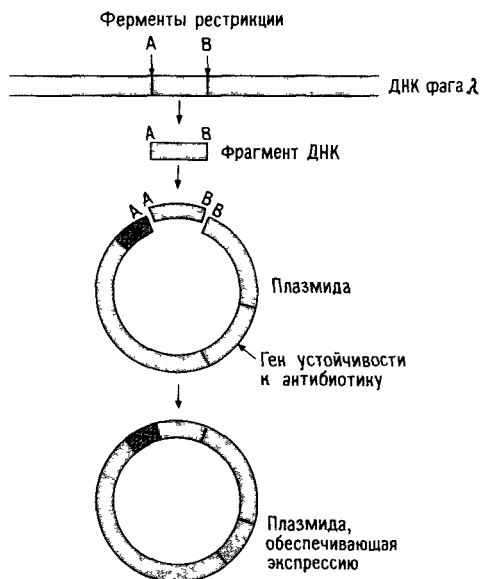


Рис 4 7 Плазмида, обеспечивающая синтез большого количества репрессора. Она несет ген *cI* фага λ , присоединенный к области промотора и оператора *lac*-оперона (Op). При смешивании клеток *E. coli* с плазмидной ДНК последняя со сравнительно низкой частотой проникает в клетки. В плазмиде присутствует ген устойчивости к антибиотику, поэтому в присутствии антибиотика растут только клетки, содержащие плазмиду, и их легко отобрать.

Однако, если просто увеличить число копий гена *cI*, количество синтезированного репрессора увеличится лишь незначительно. Напомним (гл. 1), что при умеренно высоких концентрациях репрессор выключает свой собственный ген, связываясь с $O_R 3$. Таким образом, чтобы получить очень много репрессора, нам придется заменить его обычный промотор P_{RM} каким-либо иным промотором, который не находится под контролем λ -репрессора.

Как видно из рис. 4.7, мы выбрали промотор, с которого обычно считывается ген *lacZ*. Был выделен фрагмент ДНК, содержащий этот промотор вместе с сигнальными последовательностями, необходимыми для эффективной трансляции мРНК; затем этот фрагмент был присоединен к самому началу гена *cI*. Такая конструкция, введенная в клетки в составе рекомбинантной плазмиды, обеспечивала синтез большого количества репрессора. В настоящее время получены штаммы с модифицированным промотором *lac* (он называется *tac*). В этих клетках репрессор составляет до 20% всего синтезируемого клеточного белка и его легко выделить в чистом виде.

Основные положения гл. 1 и 2

**Репрессор состоит из двух глобулярных доменов,
соединенных мостиком
примерно из 40 аминокислот
(рис. 1.6) [50, 64]**

При обработке очищенного репрессора какой-либо протеазой, например папаином, образуются два сравнительно устойчивых фрагмента (рис. 4.8). Анализ их аминокислотной последовательности показывает, что один из этих фрагментов происходит из N-концевой части репрессора (остатки 1–92), а другой – из C-концевой (остатки 132–236).

Оба фрагмента ведут себя как типичные глобулярные белки, и их можно легко разделить. Плотное упаковывание участки белков обычно более устойчивы к протеазам, чем участки, находящиеся в развернутой конформации, поэтому эксперименты по расщеплению позволяют показать, что N- и C-концевые участки образуют два отдельных домена.

При повышении температуры белки или их домены переходят в неупорядоченное состояние (денатурируют), причем каждый домен обладает своей собственной характерной температурой денатурации. Если измерять температуру денатурации для каждого из доменов по отдельности, то окажется, что N-концевой фрагмент репрессора денатурирует при температуре примерно на 20°C ниже, чем C-концевой (рис. 4.9).

При нагревании интактного репрессора наблюдаются два отдельных пика денатурации, которые в точности соответ-

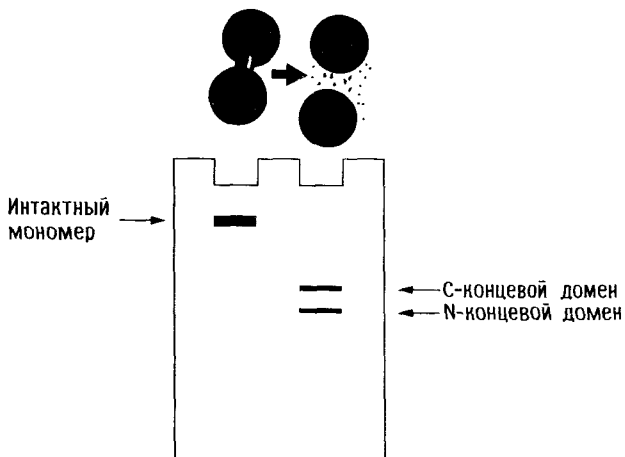


Рис. 4.8. Протеолитическое расщепление λ -репрессора. Один из способов выявления доменов в составе какого-либо белка состоит в том, чтобы выяснить, не содержит ли он участки, сравнительно устойчивые к протеолизу. Папаин легко расщепляет сегмент λ -репрессора с 93 по 131 остаток, но N- и С-концевая области не расщепляются. Эти домены можно разделить с помощью гель-электрофореза, поскольку они имеют разный размер и образуют в геле две полосы.

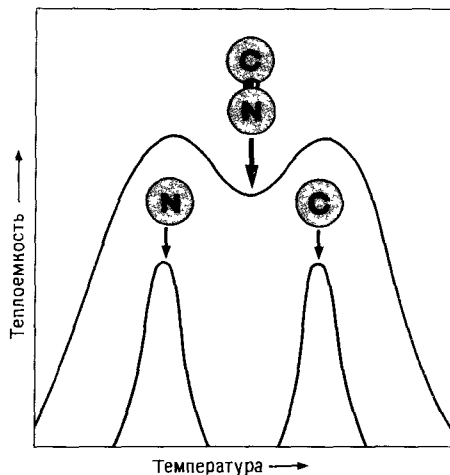


Рис. 4.9. Денатурация λ -репрессора и его выделенных доменов. Разворачивание молекулы λ -репрессора происходит в два этапа при двух разных температурах, которые соответствуют температурам денатурации изолированных доменов. (Денатурацию исследуют с помощью прибора, который называется сканирующим калориметром. При денатурации происходит поглощение тепла, изменение количества которого по мере увеличения температуры и измеряет сканирующий калориметр.)

ствуют пикам денатурации изолированных фрагментов. Следовательно, даже в составе интактной молекулы домены денатурируют более или менее независимо. Исследования с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) также указывают, что связь N- и C-концевого доменов в составе интактного репрессора отличается значительной гибкостью.

**Репрессор димеризуется главным образом
благодаря взаимодействию C-концевых доменов
(рис. 1.7) [1, 4, 50]**

Анализ с помощью гель-фильтрации и седиментации показывает, что при низкой концентрации (10^{-9} М) репрессор находится преимущественно в виде мономера, при более высокой (10^{-7} М) – преимущественно в виде димера, а при очень высокой концентрации (10^{-5} М) – в основном в виде тетрамера. Выделенные C-концевые домены (остатки 132–236) образуют димеры и тетрамеры почти столь же эффективно, как и интактные мономеры, а N-концевые домены к этому не способны (рис. 4.10). Некоторые взаимодействия между N-концевыми доменами выявляются с помощью рентгеноструктурного анализа.

Учитывая, что константа равновесия для димеризации интактного репрессора равна $K = 2 \cdot 10^{-8}$ М (см. ниже), а концентрация репрессора в лизогенных клетках составляет примерно $4 \cdot 10^{-7}$ М, можно заключить, что около 95% репрессора в этих клетках находится в виде димера и 5% – в виде мономера. Концентрация репрессора, при которой половина молекул находится в виде тетрамера, по крайней мере в 100 раз выше, чем его концентрация в лизогенных клетках, поэтому *in vivo* образуется очень мало тетрамеров репрессора.

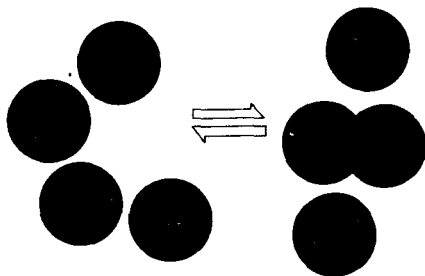


Рис 4.10 Димеризация расщепленного λ -репрессора. Расщепление папаином практически не сказывается на способности C-концевого домена λ -репрессора к димеризации

Димер репрессора связывается своими N-концевыми доменами с операторным участком длиной 17 пар оснований (рис. 1.9)

Рис. 1.9 предполагает, что установлены три важных факта.

- Во-первых, один операторный участок связывает один димер репрессора.

- Во-вторых, димер образуется до связывания мономеров с ДНК, т. е. мономеры не связываются с ДНК по отдельности.

- В-третьих, с ДНК контактирует только N-концевой домен. Рассмотрим эти три положения по отдельности.

*Один операторный участок
связывает один димер репрессора
[1, 4, 55]*

Важный подход к анализу связывания ДНК с белками основан на изучении связывания их с нитроцеллюлозными фильграми (рис. 4.11). Этот метод позволяет аккуратно определять концентрации компонентов в состоянии равновесия и кинетические параметры реакций.

Метод основан на том, что двухцепочечная ДНК свободно проходит через фильтр, тогда как репрессор, подобно боль-

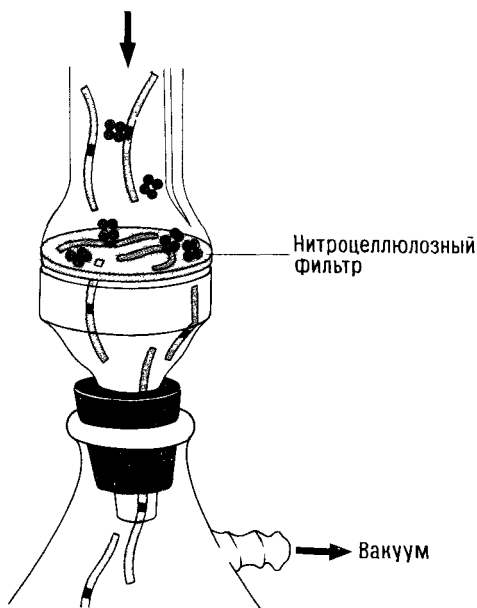


Рис. 4.11. Анализ связывания ДНК с белками методом фильтрации. ДНК несет радиоактивную метку, а белок – нет. Чем выше концентрация белка, тем больше ДНК задерживается на фильтре.

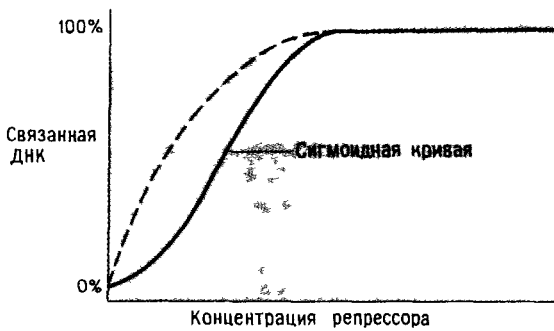


Рис 4 12 Связывание репрессора с ДНК Штриховая кривая — пример так называемой кривой Михаэлиса-Ментен. Она описывает реакцию связывания, когда димер репрессора стабилен при любых концентрациях и с операторным участком $O_R 1$ связывается единственный димер. В действительности связывание с ДНК фага λ описывается сигмоидной кривой (Строго говоря, под концентрацией репрессора должна подразумеваться концентрация свободного репрессора $[R]$, т. е. общая концентрация репрессора $[R_T]$ минус концентрация репрессора, связанного с оператором $[O_R]$). Однако в данном случае репрессор находится в большом избытке по отношению к оператору, поэтому $[R] \approx [R_T]$.)

шинству других белков, остается на нем ДНК, связанная с белком, задерживается на фильтре, и если она помечена радиоактивным изотопом (например, ^{32}P), легко измерить, какая часть ДНК и, следовательно, репрессора задерживается на фильтре при различных условиях. Например, при высокой концентрации ДНК, когда все молекулы репрессора связаны, зная число молекул ДНК, задержавшихся на фильтре, можно определить число активных, т. е. способных связывать ДНК, молекул репрессора в данном препарате.

На рис 4 12 приведена зависимость доли связанных с репрессором молекул ДНК, несущих единственный операторный участок $O_R 1$, от концентрации репрессора. Кривая построена по данным связывания ДНК с фильтрами. Для того чтобы получить каждую точку этой кривой, смесь репрессора при данной концентрации и ДНК инкубировали до достижения равновесия, а затем проводили фильтрацию. Удивительная особенность этой кривой заключается в том, что она имеет S-образную, или сигмоидную, форму и отличается от кривой, ожидаемой, например, для случая, когда для связывания ДНК с фильтром достаточно, чтобы с оператором был связан один мономер репрессора, или, что то же самое, когда димер репрессора совершенно стабилен. Такая кривая изображена на рисунке штриховой линией.

Проанализируем штриховую кривую на рис 4 12 более

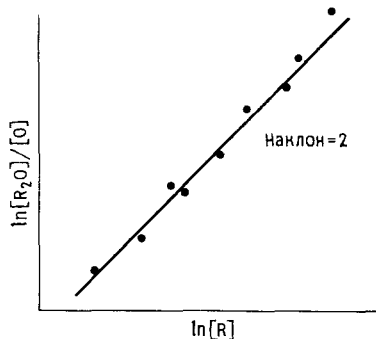
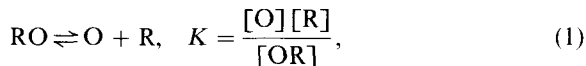


Рис 4.13 Анализ сигмоидной кривой связывания. После преобразования уравнения (4) имеем $[R]^2/K = [R_2O]/[O]$. Таким образом зависимость $2 \ln [R]$ от $\ln [R_2O]/[O]$ должна изображаться прямой с наклоном 2, как это и имеет место в действительности. Если бы репрессор связывался в виде тетрамера наклон прямой был бы равен 4. Этот график представляет собой ту же сигмоидную кривую, что и на рис 4.12, но построенную в других координатах.

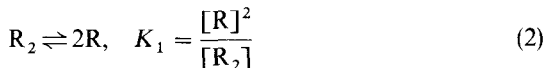
подробно. Эта кривая должна соответствовать следующей простой реакции



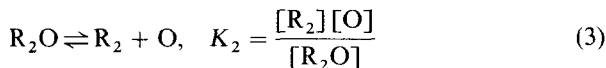
где $[R]$ – концентрация репрессора, $[O]$ – концентрация оператора, K – константа равновесия реакции (обратите внимание, что здесь, как и во всей книге, мы представляем константу равновесия как константу диссоциации). Величина K равна концентрации репрессора в средней точке кривой, т.е. при $[O] = [OR]$.

Почему же кривая, описывающая взаимодействие λ -репрессора со своим оператором, имеет сигмоидную форму? Дело в том, что эта реакция идет не в одну стадию, как предполагает уравнение (1), а в две. Первая из них – димеризация двух мономеров репрессора, а вторая – связывание димера с оператором.

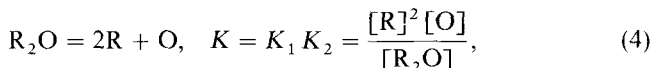
Димеризация



Связывание с оператором



Таким образом, суммарную реакцию можно представить в виде



где $[R]$ – концентрация мономера репрессора, $[R_2]$ – концентрация димера.

В соответствии с этой моделью димеры λ -репрессора, способные прочно связываться с ДНК, легко диссоциируют на мономеры, которые связываются с ДНК очень слабо. Таким образом, при низкой концентрации репрессор не может связаться с ДНК, поскольку находится преимущественно в виде мономера. При увеличении концентрации мономеры ассоциируют, образуют димеры и связываются с оператором.

Из уравнения (4) следует, что если представить данные рис. 4.12 в виде зависимости $\ln [R_2O]/[O]$ от $\ln [R]$, то должна получиться прямая с наклоном 2. Именно такая прямая изображена на рис. 4.13.

Димер образуется до связывания с ДНК [1, 4, 51]

Эксперименты, подобные изображенному на рис. 4.14, мы называем экспериментами с изменением порядка введения компонентов. Концентрированный раствор репрессора разводят, например, в 100 раз в двух пробирках. В одной пробирке содержится меченая операторная ДНК, в другой – нет. Во вторую пробирку добавляют меченую ДНК, смеси фильтруют и определяют содержание комплекса репрессор – оператор.

Результаты этих двух опытов, как ни странно, в корне различаются. ДНК, добавленная до репрессора, в основном связывается с фильтром, а добавленная после – в основном нет. Если мы теперь продолжим инкубацию пробирок, отбирая время от времени пробы, то обнаружим, что ДНК, добавленная после репрессора, также постепенно начинает связываться с фильтром; на это уходит около часа.

Мы объясняем эти результаты следующим образом. В исходном концентрированном растворе значительная часть репрессора находится в виде димера. Если репрессор добавляют в раствор, уже содержащий ДНК, димеры быстро связываются с оператором, не успев диссоциировать на мономеры. Если же ДНК в пробирке отсутствует, то димеры диссоциируют на мономеры до тех пор, пока концентрация димеров не установится на гораздо более низком равновесном уровне, характерном для разбавленных растворов. Если теперь добавить ДНК, репрессор будет медленно связываться с опе-

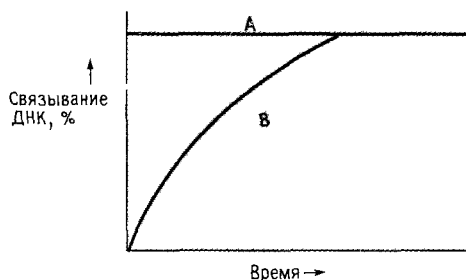
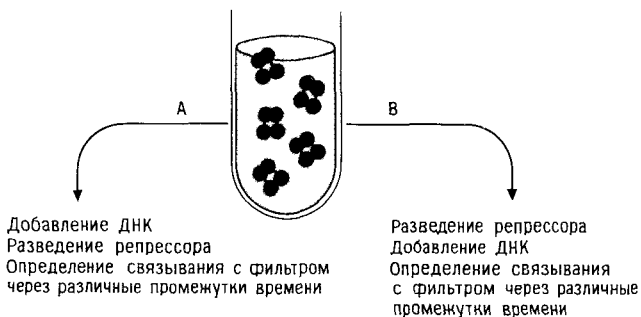


Рис. 4.14 Эксперимент с изменением порядка добавления компонентов. Мономеры репрессора связываются с ДНК медленно, поскольку они вначале должны образовать димеры, а этот процесс при низкой концентрации репрессора идет медленно. Димеры связываются с ДНК быстро. Если ДНК присутствует в смеси до добавления репрессора, димеры успевают связаться еще до диссоциации.

атором и лимитирующей стадией станет образование димерного промежуточного продукта.

Оценки константы равновесия реакции димеризации (2) дают величину $K_1 = 2 \cdot 10^{-8}$ М. Зная эту величину и количество репрессора, необходимое для связывания половины максимального количества ДНК в экспериментах, подобных приведенному на рис. 4.12, можно вычислить K_2 . Для связывания с $O_R 1$ в условиях, близких к внутриклеточным, т.е. при 0,2 М KCl и 37 С, $K_2 = 3 \cdot 10^{-9}$ М. В этих условиях время жизни комплекса репрессора с оператором составляет величину порядка нескольких секунд. При более низких температуре и концентрации соли, когда связывание прочнее, время жизни комплекса достигает минут и даже часов.

Весьма полезным методом изучения ДНК-белковых взаимодействий является так называемый футпринтинг (рис. 4.15). Некий белок, связанный с определенным участком ДНК, защищает его от расщепления, например, ДНКазой, которая в обычных условиях случайным образом вносит в ДНК одноцепочечные разрывы. На практике обычно вначале получают фрагменты ДНК, меченные ^{32}P по одному из концов одной цепи. Затем добавляют такое количество ДНКазы, чтобы внести в каждую молекулу в среднем не более одного разрыва, ДНК денатурируют и проводят гель-электрофорез.

В геле образуется «лесенка», причем каждая следующая ступенька, считая снизу вверх, отвечает цепочке ДНК, отщепленной на один нуклеотид дальше от меченого конца, чем предыдущая. Если теперь провести такой же эксперимент в присутствии репрессора, то в том месте «лесенки», которое соответствует участку ДНК, связанному с репрессором, появ-

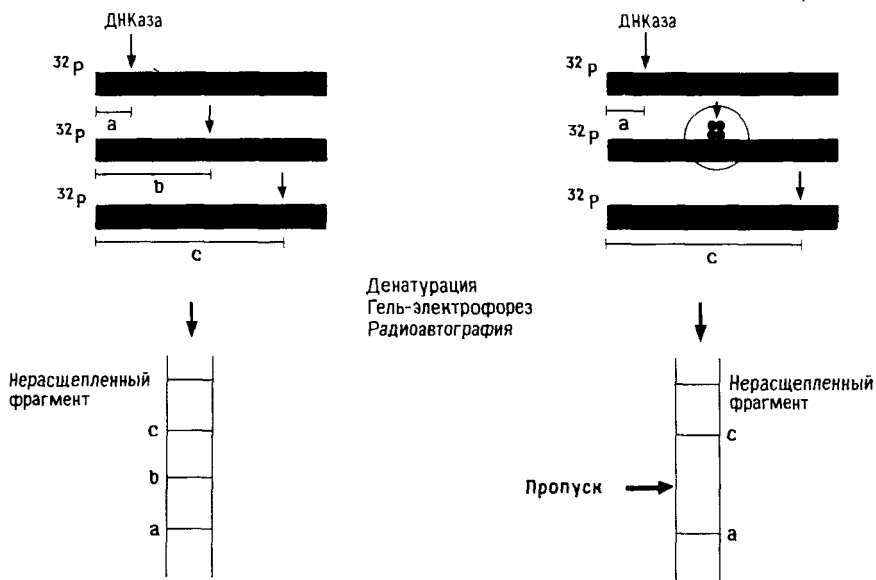


Рис. 4.15. ДНКазный футпринтинг. Продукты реакции выявляют с помощью радиоавтографии, поэтому немеченая ДНК не обнаруживается. После гель-электрофореза образуется «лесенка» из полос, каждая из которых соответствует цепочке ДНК, на один нуклеотид более длинной, чем в следующей «ступеньке», если идти сверху вниз.

вится пробел (отпечаток, или футпринт) Другими словами, там, где связан репрессор, ДНКаза не может внести разрыв в ДНК, и поэтому фрагменты, которые образуются в результате расщепления чистой ДНК в этом участке, отсутствуют

Сходный метод изучения ДНК-белковых взаимодействий основан на использовании метилирующего агента диметилсульфата (ДМС) В двухцепочечной ДНК ДМС переносит метильную группу главным образом на атомы двух оснований, G и A G метилируется по атому, выступающему в большой желобок (азот N7 согласно общепринятой нумерации атомов), а A – по атому, выступающему в малый желобок (азот N3)

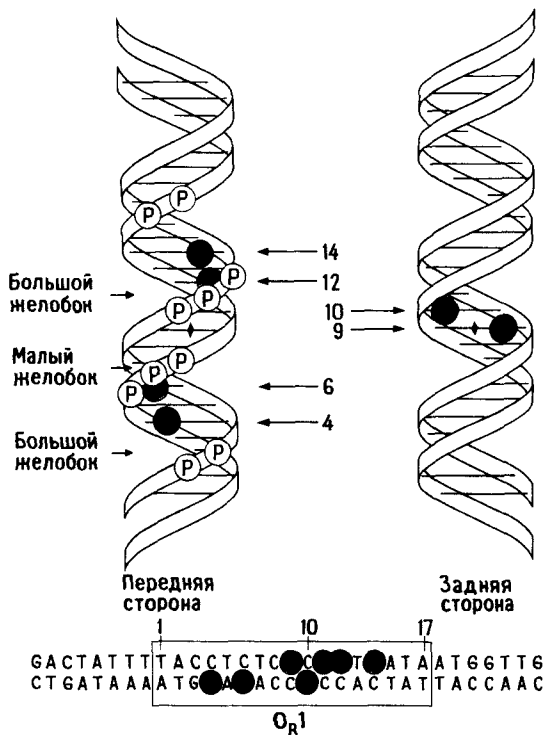


Рис 4 16 Участки оператора, контактирующие с репрессором Внизу приведена нуклеотидная последовательность оператора и отмечены звенья G, которые репрессор защищает от метилирования диметилсульфатом Эти защищенные звенья показаны на спирали ДНК Четыре из звеньев G, участвующих во взаимодействии, видны в большом желобке на передней стороне спирали G в положении 11 не просматривается, но, подобно другим G на этой стороне спирали, он должен контактировать с α -спиралью, лежащей в большом желобке с этой стороны Еще два звена, контактирующие с репрессором, лежат на задней стороне спирали На рисунке показаны также фосфатные группы, взаимодействующие с репрессором Ромбиком отмечена ось симметрии второго порядка

В месте метилирования чувствительность ДНК к химическому расщеплению резко увеличивается. В результате расщепления молекул по метилированным участкам после электрофореза образуется «лесенка», каждая ступенька которой соответствует расщеплению по метилированным звеньям А или G. Репрессор, связавшись с ДНК, может защитить соответствующие основания от метилирования; это позволяет обнаружить пары оснований, которые расположены ближе всего к связанному белку. Иногда в присутствии белка по непонятным причинам увеличивается скорость метилирования определенных участков; такое же явление наблюдается и при ДНКазном расщеплении.

В экспериментах по ДНКазному футпринтингу репрессор защищает участок оператора длиной 17 пар оснований плюс еще по несколько пар оснований с обеих сторон. Как видно из рис. 4.16, он защищает от метилирования под действием ДМС и звенья G в пределах оператора, но не вне его. На метилирование А репрессор не влияет, и это согласуется с представлением о том, что он располагается в большом, а не в малом желобке оператора.

Итак, отметим главное: изолированные N-концевые домены ведут себя подобно интактным димерам, за исключением того, что для защиты от расщепления необходима более высокая их концентрация. Таким образом, единственный вклад C-концевого домена в связывание димера с операторным участком состоит в том, что он увеличивает силу связывания, удерживая вместе два N-концевых домена. Имеются данные, что и в клетке N-концевые домены в отсутствие C-концевых связываются с оператором: штамм *E. coli*, в котором образуется большое количество дефектного репрессора, включающего только остатки 1–92, устойчив к суперинфекции фагом λ .

**Правый оператор состоит из трех участков
связывания репрессора
длиной 17 пар оснований каждый.
Репрессор и белок Cro
связываются с одной и той же стороны
двойной спирали
в каждом участке связывания
(рис. 1.16 и 1.22).**

При анализе O_R обнаруживаются три сходные последовательности длиной по 17 пар оснований. Каждая из них обладает несовершенной вращательной симметрией второго порядка. Левый оператор O_L также состоит из трех сходных участков (табл. 2.1).

Как показывают данные по связыванию с фильтрами и результаты футпринтинга, и репрессор, и *Sco* могут связываться с каждым из этих участков по отдельности. Оба белка защищают от метилирования звенья *G*, лежащие с одной стороны двойной спирали каждого из участков связывания (см. левую часть рис. 4.16). Кроме того, репрессор в отличие от *Sco* защищает один из двух звеньев *G*, лежащих с задней стороны двойной спирали примерно посередине каждого участка связывания. Ниже мы покажем, что в этих взаимодействиях с задней стороны спирали участвуют гибкие «руки» λ -репрессора.

Для идентификации тех фосфатных групп ДНК, которые контактируют со связанным белком, можно использовать химический агент этилнитрозомочевину. На рис. 4.16 отмечены фосфатные группы операторного участка $O_R 1$, с которыми контактирует репрессор. Они лежат по одну сторону двойной спирали. Некоторые из этих групп контактируют с белком *Sco*, в том числе шесть «внутренних» фосфатов, но не четыре «внешних» (считая от середины операторного участка к его краям). Как в случае репрессора, так и в случае *Sco* фосфаты, с которыми они контактируют, располагаются симметрично относительно центральной пары оснований операторного участка.

Метод, основанный на использовании этилнитрозомочевин для идентификации контактирующих с белками фосфатных групп, называется методом защиты от этилирования. Он позволяет определить влияние присоединения этильных групп к фосфатам, находящимся в различных положениях вдоль цепи ДНК, на последующее связывание белка. Даже если эти опыты свидетельствуют о контактировании того или иного фосфата с белком, следует всегда учитывать, что на самом деле этилирование фосфата может препятствовать связыванию с ним белка.

Мутантные операторы [2]

Во многих точках последовательности операторного участка длиной 17 пар оснований можно произвести замену пар оснований, приводящую к уменьшению эффективности связывания репрессора с данным участком. Много мутантных операторов содержат ДНК фагов λvir , которые способны расти в присутствии λ -репрессора. Первый из выделенных фагов λvir содержал мутации в $O_L 1$, $O_R 1$ и $O_R 2$. Если в дальнейшем использовать этот фаг для отбора мутантов, способных расти при более высоких концентрациях репрессора, чем в данном лизогене, то можно выделить новые мутанты, несущие допол-

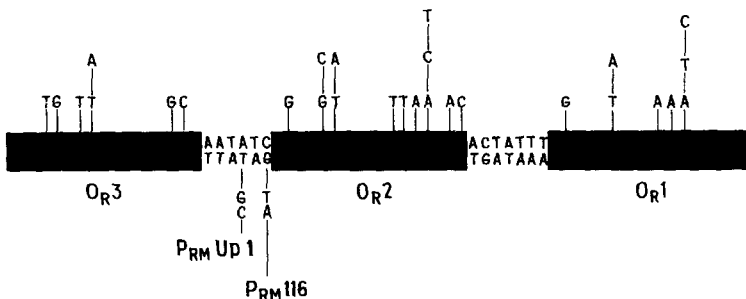


Рис 4.17 Мутации в области O_R . Этот набор мутаций следует сравнить с последовательностями, приведенными в табл. 2.2. Мутации в положении 3 приводят в основном к уменьшению эффективности связывания Cro , но не репрессора, а мутации в положениях 8 и 9 — в основном к снижению эффективности связывания репрессора, но не Cro . Мутации в остальных положениях оператора сопровождаются уменьшением связывания обоих белков. Мутация $P_{RM}U_p - 1$ активирует промотор P_{RM} в отсутствие репрессора, а мутация $P_{RM}116$ инактивирует P_{RM} .

нительные изменения в тех же или других операторных участках.

На рис. 4.17 указаны некоторые мутации, обнаруженные в O_R . Почти каждое звено оператора может быть местом возникновения мутации, приводящей к уменьшению эффективности связывания репрессора и (или) Cro . Наибольшее влияние на связывание репрессора оказывают мутации в звеньях 2, 4 и 6, и, как видно из табл. 2.2, именно эти положения наиболее консервативны. Основания в остальных положениях используются репрессором и Cro для того, чтобы различать операторные участки (см. рис. 2.11). Мутации, произошедшие в звеньях между операторными участками, — $P_{RM}U_p - 1$ и $P_{RM}116$ — не влияют на связывание репрессора и Cro .

Связывание со сверхспиральной и линейной ДНК [37]

Репрессор связывается одинаково прочно с O_R1 как в случае линейных, так и в случае сверхспиральных (со знаком минус) молекул. Судя по этому результату, репрессор скорее всего не оказывает существенного влияния на структуру ДНК. Этот вывод подтверждается результатами рентгеноструктурного исследования комплекса репрессора с оператором (см. ниже). Если бы репрессор раскручивал ДНК, например, на один виток, он гораздо прочнее связывался бы со сверхспиральными, чем с линейными молекулами.

**Репрессор связывается
с тремя операторными участками O_R ,
проявляя при этом
альтернативную попарную кооперативность.
Кооперативность обеспечивается
взаимодействиями между С-концевыми доменами
соседних димеров
(рис. 1.16–1.19) [10, 33].**

С помощью футпринтинга с применением ДНКазы или ДМС можно оценить сродство репрессора к каждому операторному участку. Эксперимент проводят при разных концентрациях репрессора, чтобы найти такую концентрацию, при которой половина этих участков занята и потому защищена от воздействия нуклеазы или какого-либо химического агента. Для изучения кооперативности таким методом используют ДНК с O_R , содержащим один, два или все три операторных участка.

Как указано на рис. 4.18, сродство к репрессору O_{R1} и O_{R2} , входящих в состав оператора дикого типа, примерно одинаково, в то время как их «внутреннее» сродство в составе ДНК, несущей тот или другой участок по отдельности, различается более чем в 10 раз. Другими словами, репрессор связывается с операторными участками, входящими в состав оператора дикого типа, кооперативно. Сродство участка O_{R3} увеличивается по сравнению с его «внутренним» сродством только при условии, что O_{R1} несет мутацию. В этом случае репрессоры связываются с O_{R2} и O_{R3} кооперативно.

Три участка оператора O_L также связываются с репрессо-

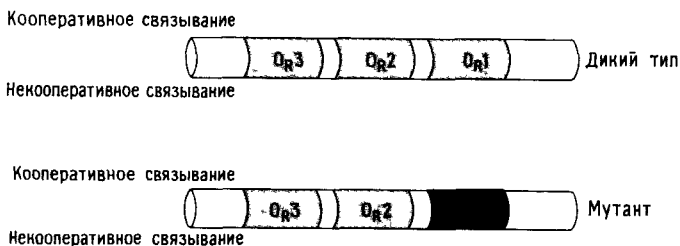


Рис 4.18 Сродство участков оператора к интактному репрессору Числа указывают относительное количество димера репрессора, необходимое для защиты соответствующего участка до уровня, составляющего половину от максимального в экспериментах по ДНКазному футпринтингу Таким образом, эти числа пропорциональны константам диссоциации. Сродство соседствующих и искусственно разделенных сайтов различно (кооперативное и некооперативное связывание соответственно). Если вместо интактного репрессора использовать N-концевой домен, никакой разницы между кооперативным и некооперативным связыванием не наблюдается.

ром согласно правилу попарной альтернативной кооперативности. Как и в случае O_R , наибольшим «внутренним» средством обладает участок O_L1 , а сродство участков O_L2 и O_L3 примерно одинаково. В составе оператора дикого типа O_L1 и O_L2 связывают репрессор одинаково прочно, а если O_L1 несет мутацию, то O_L2 и O_L3 связывают репрессор кооперативно.

Сродство выделенных N-концевых доменов к трем участкам O_R соответствует сродству полного репрессора к каждому из этих участков по отдельности. Другими словами, удаление S-концевого домена никак не сказывается на способности репрессора различать эти три участка, но полностью лишает его кооперативности, которая наблюдается при связывании димеров с соседними участками. Энергия взаимодействия между димерами репрессора, связанными с ДНК, составляет примерно -2 ккал/моль.

Далее мы рассмотрим более подробно, какое влияние на экспрессию генов оказывает альтернативная попарная кооперативность.

**В лизогенных клетках
репрессор обычно связан с O_R1 и O_R2 .
Связанные молекулы репрессора
выключают транскрипцию гена *cro*,
осуществляющуюся слева направо,
и стимулируют транскрипцию гена *cI*,
идущую справа налево.
При более высоких концентрациях
репрессор связывается с O_R3
и выключает транскрипцию *cI*
(рис. 1.16 и 1.19) [39, 41, 42, 43].**

Этот вывод основан отчасти на результатах экспериментов, в которых изучали действие репрессора, связанного с каждым операторным участком по отдельности, на активность промоторов P_R и P_{RM} *in vivo*. Результаты такого связывания приведены на рис. 1.12 (репрессор связан с O_R2), 1.13 (репрессор связан с O_R1) и 1.14 (репрессор связан с O_R3). На рис. 4.19 представлены бактериальные штаммы, специально сконструированные нами для проведения такого анализа.

Вначале мы выделили участок ДНК, содержащий оба промотора, и присоединили к одному из его концов ген *lac Z*, лишенный собственного промотора. Продукт гена *lac Z*, β -галактозидаза, можно было легко обнаружить. В одном штамме транскрипция *lac Z* начиналась с промотора P_{RM} (рис. 4.19, А), а в другом – с промотора P_R (рис. 4.19, Б). Исходная конструкция содержала оператор O_R дикого типа, в других случаях присутствовали только один или два функциональных участка

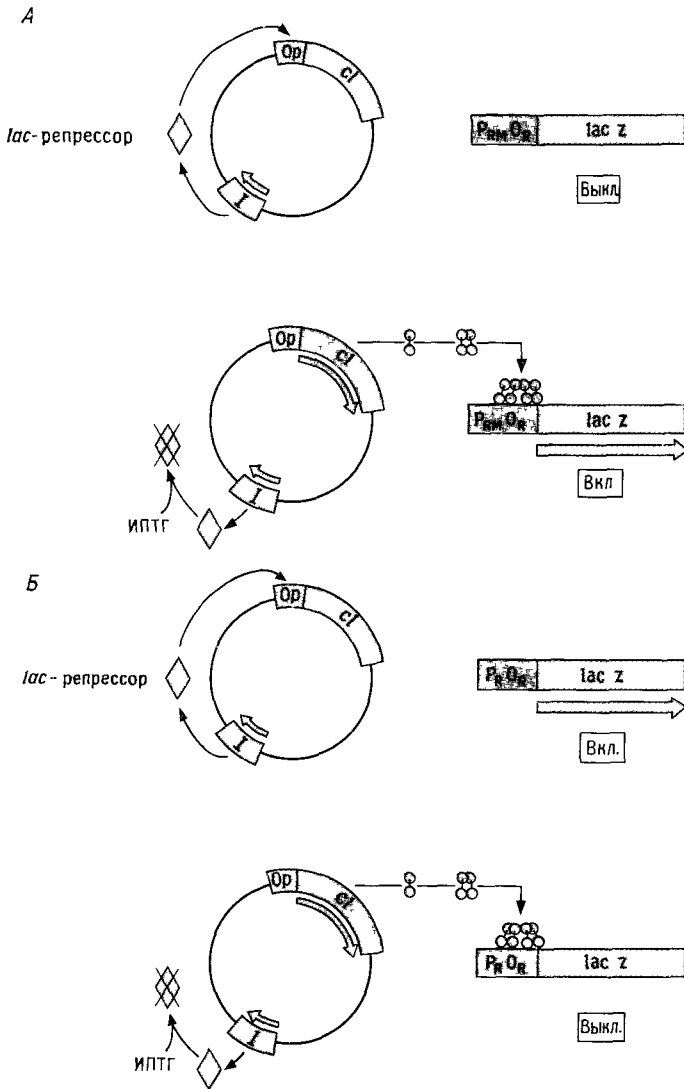


Рис. 4.19. Бактериальные штаммы, сконструированные для анализа действия изолированных операторных участков. Оба типа клеток содержат плазмиду, обеспечивающую синтез λ -репрессора под контролем lac -репрессора. Кроме того, клетки *A* содержат конструкцию P_{RM} - $lacZ$, а клетки *B* P_R - $lacZ$. Чем больше ИПТГ добавлено в среду, тем больше λ -репрессора образуется. Уровень β -галактозидазы в клетках обоих типов, растущих при различных концентрациях ИПТГ, показывает, как каждый из промоторов отвечает на различные концентрации λ -репрессора. Op обозначает lac -оператор, который вместе с lac -промотором был встроен перед геном cI

связывания репрессора, а активность других участков была подавлена с помощью мутаций.

Клетки обоих типов, представленные на рис. 4.19, *A* и *B*, содержали также в составе плазмиды ген, кодирующий λ -репрессор, причем концентрацию репрессора можно было варьировать. Плазида несла ген *cI*, транскрибируемый с промотора *lac* (*Plac*), и ген *lac*-репрессора *lacI*, продукт которого выключает *lac*-промотор. Количество λ -репрессора, синтез которого детерминируется этой плазмидой, можно регулировать, добавляя ИПТГ. Данное соединение инактивирует *lac*-репрессор, в результате чего снимается репрессия *lac*-промотора и синтез λ -репрессора увеличивается.

В обычных условиях репрессор и белок Cro, которые начинают синтезироваться с промоторов P_{RM} и P_R соответственно, влияют на активность промотора по механизму обратной связи. Однако в наших экспериментах β -галактозидаза не оказывала влияния ни на один из промоторов, устраняя тем самым сложности, связанные с регуляцией по механизму обратной связи. Таким образом, этот подход позволяет выяснить, как действует связывание репрессора с различными участками в составе O_R на промоторы P_R и P_{RM} .

Из рис. 4.20 видно, что при низких концентрациях λ -репрессора активность промотора P_{RM} повышается, а при высоких падает. Далее, по мере того как репрессор включает транскрипцию с P_{RM} , он координированно выключает транскрипцию с P_R , причем подавление активности P_R в два раза от максимального значения происходит при такой концентрации репрессора, когда P_{RM} наполовину активирован. Максимальная активация P_{RM} наблюдается при такой концентрации репрессора, какая обнаруживается в лизогенных клетках. При этом активность P_R подавлена более чем на 99%.

В каком порядке должны заполняться участки O_R , чтобы вначале произошло включение P_{RM} и выключение P_R , а затем выключение P_{RM} ? Для ответа на этот вопрос были проведены эксперименты, подобные представленным на рис. 4.20, но теперь λ -операторы несли мутации в двух операторных участках каждый. Эти мутации подавляли связывание репрессора с поврежденными участками, но промоторы оставались неповрежденными. Это позволило изучить эффект связывания репрессора только с одним из участков. Результаты можно суммировать следующим образом.

● $O_{R2}^- O_{R3}^-$. Репрессор, связанный с O_{R1} , выключает P_R , но не активирует P_{RM} (рис. 4.21, *A*).

● $O_{R1}^- O_{R2}^-$. Репрессор, связанный с O_{R3} , не может ни активировать P_{RM} , ни подавлять P_R (рис. 4.21, *B*).

● $O_{R1}^- O_{R3}^-$. Репрессор, связанный с O_{R2} , активирует P_{RM} и подавляет P_R (рис. 4.21, *B*).

В табл. 4.2 суммированы данные об активности промото-

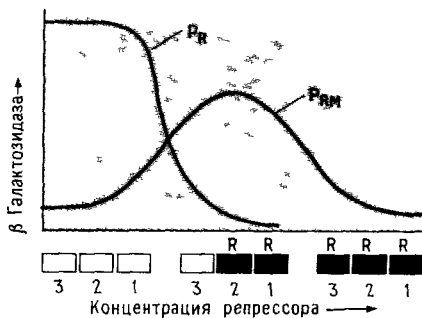


Рис 4 20 Регуляторное действие репрессора *in vivo*. На этом графике суммированы результаты опытов с клетками двух типов, изображенными на рис 4 19. В обоих случаях измеряли количество β-галактозидазы образующейся при разной концентрации ИПТГ. Середины кривых репрессии и активации приходятся на одну и ту же концентрацию ИПТГ, т.е. соответствуют одной и той же концентрации репрессора. Концентрация репрессора, необходимая для максимальной активации P_{RM} , примерно соответствует уровню, который обнаруживается в лизогене. Прямоугольники в нижней части рисунка условно изображают состояние каждого операторного участка при различных концентрациях репрессора. Темные прямоугольники соответствуют занятым участкам.

ров P_R и P_{RM} в случае, когда репрессор связывается с одним операторным участком.

Внимательное рассмотрение кривых на рис 4 21 позволяет увидеть результат кооперативного связывания репрессора с соседними участками. Например, хотя связывание репрессора только с O_R2 активирует P_{RM} и подавляет P_R , для такой активации и репрессии в случае мутантных O_R1 и O_R3 требуется больше репрессора. Объясняется это тем, что мутация устраняет вспомогательный кооперативный эффект репрессору приходится связываться с O_R2 без «поддержки» со стороны репрессора, связанного с O_R1 .

Еще сильнее проявляется кооперативный эффект в том случае, когда эксперимент, проиллюстрированный на рис 4 20, проводят с оператором, у которого участок O_R1 несет мутацию, а O_R2 и O_R3 являются участками дикого типа. В этом эксперименте используют мутантный промотор, присоединенный к гену *lacZ*, его обозначают $P_{RM}Up-1$. Он эффективно работает в отсутствие репрессора. С помощью этого мутанта легко оценить негативное и позитивное действие репрессора на активность P_{RM} . Рис 4 22 иллюстрирует удивительный результат такого эксперимента: при концентрации репрессора, лишь слегка превышающей ту, что приводит к активации P_{RM} в случае оператора дикого типа, происходит репрессия промотора в случае O_R1^- .

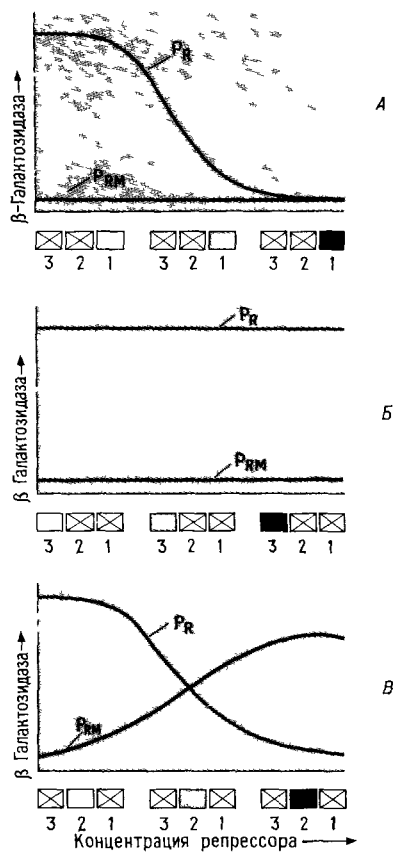


Рис 4.21 Регуляторное действие репрессора, связанного с единственным регуляторным участком *in vivo*. Эти кривые суммируют результаты экспериментов подобных тем, что проиллюстрированы на рис 4.20 за исключением того, что здесь использованы мутантные операторы. Кривые описывают влияние на активность промоторов P_R и P_{RM} связывания репрессора с O_{R1} (A), O_{R3} (B) и O_{R2} (B). Прямоугольники с крестами означают, что соответствующие операторные участки содержат мутацию и не могут связывать репрессор. Серые прямоугольники – участки частично занятые репрессором, черные прямоугольники – полностью занятые участки.

Можно было бы думать, что в результате мутации O_{R1} увеличивается сродство репрессора к O_{R3} , однако на самом деле наблюдаемый эффект объясняется альтернативной попарной кооперативностью. При связывании с O_{R1} репрессор взаимодействует кооперативно с O_{R2} и O_{R3} , поэтому O_{R3} оказывается заполненным при такой концентрации репрессора, при которой он был еще свободен в составе оператора.

Таблица 4.2 Результат связывания димера репрессора с единственным участком O_R . В отсутствие репрессора P_{RM} выключен (не активирован), а P_R включен (верхняя строка)

P_{RM}	O_{R3}	O_{R2}	O_{R1}	P_R
Выключен				Включен
Выключен			x	Выключен
Включен		x		Выключен
Выключен	x			Включен

дикого типа. Как и следовало ожидать, этот эксперимент показывает также, что при связывании репрессора с O_{R2} и O_{R3} происходит выключение P_R . При этом требуется меньше репрессора, чем если интактным остается только O_{R3} , благодаря вспомогательному действию кооперативного связывания с O_{R2} и O_{R3} .

Результаты этого и других подобных экспериментов *in vivo*, в которых исследовали действие репрессора при связывании с операторами, имеющими один, два или три функциональных участка, укладываются в согласованную схему, если учесть соответствующие правила взаимодействия репрессора с оператором, установленные с помощью экспериментов *in vitro* (табл. 4.2). Все эти данные позволяют заключить, что O_R , связанный с репрессором *in vivo*, может находиться в двух основных состояниях. В лизогенных клетках репрессор связывается прежде всего кооперативно с O_{R1} и O_{R2} ; тем самым он стимулирует P_{RM} и подавляет P_R . При более высокой концентрации репрессор некооперативно связывается с O_{R3} и выключает P_{RM} (табл. 4.3).

(Одно замечание по поводу мутаций. Некоторые мутации, о которых шла речь в предыдущих разделах и будет упоми-

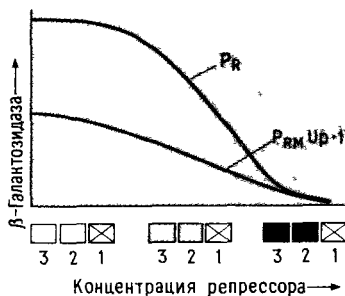


Рис 4.22 Альтернативная попарная кооперативность *in vivo*. Эксперимент аналогичен представленному на рис 4.21, но здесь исследовано влияние на активность промоторов P_R и $P_{RM}Up-1$ связывания репрессора с O_{R2} и O_{R3}

Таблица 4.3. Два физиологически важных состояния оператора O_R фага λ , несущего репрессор. Состояние, когда репрессор связан с O_{R1} и O_{R2} , промотор P_{RM} включен (стимулирован), а промотор P_R выключен (верхняя строка), характерно для лизогенных клеток

P_{RM}	O_{R3}	O_{R2}	O_{R1}	P_R
Включен		x	x	Выключен
Выключен	x	x	x	Выключен

наться в последующих, исходно возникли в операторах различных фагов λvir , отобранных по способности к литическому росту в присутствии репрессора. Другие присутствовали в мутантах, отобранных с помощью специально сконструированных штаммов фагов и бактерий.)

Многие проявления действия репрессора *in vivo* можно воспроизвести *in vitro*. Например, очищенная РНК-полимераза может использовать для транскрипции промотор P_R , и такая транскрипция блокируется репрессором или Cro. Ни один из этих белков не действует на полимеразу, уже связанную с P_R — факт, подтверждающий мысль о том, что оба белка конкурируют с полимеразой за связывание. При концентрации, достаточной для заполнения O_{R1} и O_{R2} , репрессор стимулирует транскрипцию с P_{RM} , а при более высокой концентрации подавляет ее. В дальнейшем мы еще вернемся к вопросу об активности репрессора как белка, осуществляющего позитивную регуляцию.

**Cro вначале связывается с O_{R3} ,
а затем с O_{R1} и O_{R2} ;
таким образом, он вначале выключает P_{RM} ,
а затем P_R
(рис. 4.23)**

Некоторые общие сведения о белке Cro
[19, 20, 22, 31, 47, 44, 56]

Одно из первых указаний на существование белка Cro было получено при проведении следующего генетического эксперимента (рис. 4.23). В лизогенных по фагу λ клетках, несущих температурочувствительную мутацию в гене cI , была удалена большая часть генов слева от cI и справа от cro . О присутствии интактного гена cI свидетельствовала иммунность клеток к фагу λ при низкой температуре (30°C).

Если клетки выращивали при 42°C, т. е. в условиях, когда мутантный репрессор неактивен, у них наблюдались неожиданные свойства: клетки не только не были иммунными, как

ожидалось, но они были «антииммунными». Это означает, что фаг λ дикого типа, который вообще не мог расти на этом штамме при 30°C , при 42°C давал только прозрачные бляшки. Эффект оказался чувствителен к типу иммунности: например, фаг λ_{imm}^{434} образовывал на этом штамме нормальные мутные бляшки при обеих температурах.

Из всего этого можно было сделать только один вывод: оставшийся в бактерии участок фагового генома кодирует какой-то фактор, специфичный по отношению к области иммунности фага λ , который направляет развитие заражающих клетки фагов λ по литическому пути. В зависимости от характера эксперимента этот фактор обозначали по-разному: Ai (от англ. *anti-immunity* – антииммунность); Toi (от англ. *turn off* – выключение) или Cto. Теперь мы знаем, что единственный ген *cro*, транскрибируемый с промотора P_R , обеспечивает образование достаточного количества белка Cto, чтобы клетка стала антииммунной. Антииммунность является, очевидно, следствием частичного подавления промоторов P_L и P_R под действием Cto и связанной с этим пониженной экспрессии генов *cII* и *cIII*.

Обсудим состояние правых оператора и промотора в таких антииммунных клетках. При связывании Cto выключает P_R , но по мере роста и деления клеток концентрация Cto уменьшается и P_R снова включается. Так устанавливается состояние динамического равновесия, когда скорость синтеза Cto в точности равна скорости его разведения и, по всей вероятности, поддерживается его постоянная концентрация. В этом случае Cto снижает, но не подавляет полностью свой собственный синтез.

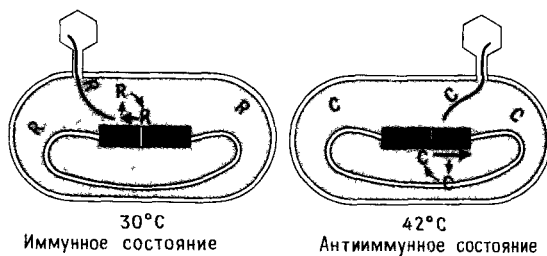


Рис 4.23 Иммунность и антииммунность Клетки содержат мутантный репрессор R, который хорошо работает при 30°C , но денатурирует при 42°C . При повышенной температуре включается синтез белка Cto (на рисунке он обозначен буквой C), но клетки не лизируются, так как все остальные фаговые гены удалены. Белок Cto направляет проникающие в клетку фаги по литическому пути развития. Если понизить температуру до 30°C , клетки снова переходят в иммунное состояние.

Исходно белок Cro был выделен из клеток, где шла литическая инфекция, в опытах по связыванию с фильтрами. Это был один из белков, которые специфически связывались с ДНК фага λ . Соответствующий ген был клонирован и соединен с различными производными *lac*-промотора. В клетках, содержащих такие плазмидные конструкции, Cro может синтезироваться в различных количествах. Если содержание белка достаточно высоко (до нескольких процентов суммарного количества), его легко выделить, и многие биохимические подходы, использованные в случае репрессора, были применены и при изучении Cro.

Белок Cro *in vivo* [42]

Клетки, несущие плазмиды, которые детерминировали синтез Cro под контролем *lac*-репрессора, использовались для изучения влияния Cro в различных концентрациях на промоторы P_{RM} и P_R *in vivo*. Результаты одного такого эксперимента, аналогичного представленным на рис. 4.20, показали, что под действием Cro P_{RM} выключается (в данном случае использовалась $P_{RM}Up-1$), а при более высокой концентрации выключается также P_R (рис. 4.24). Используя мутантные операторы аналогично тому, как это было в случае с репрессором, удалось установить результат связывания Cro с каждым из операторных участков O_R по отдельности (табл. 4.4).

Итак, в качестве белка с негативным регуляторным эффектом Cro идентичен репрессору: связываясь с O_{R1} и O_{R2} , он

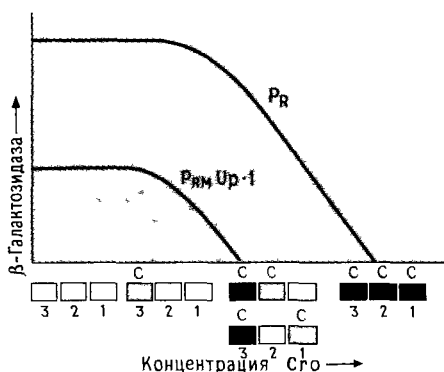


Рис. 4.24 Регуляторное действие белка Cro *in vivo*. Ген *cro* можно ввести вместо гена *cl* в бактериальные клетки (см рис. 4.19) и, добавив ИПТГ, индуцировать синтез Cro. Используя конструкции P_R-lacZ и $P_{RM}Up-1-lacZ$, можно показать, что Cro оказывает негативное действие на оба промотора фага λ .

Таблица 4.4. Влияние связывания димера Cго с единственным участком O_R . В отсутствие репрессора или Cго (верхняя строка) P_{RM} и P_R включены, поскольку был использован мутант $P_{RM} Up - 1$

$P_{RM} Up - 1$	O_R3	O_R2	O_R1	P_R
Включен				Включен
Включен			x	Выключен
Включен		x		Выключен
Выключен	x			Включен

Таблица 4.5. Физиологически важные состояния оператора O_R фага λ , связанного с Cго

$P_{RM} Up - 1$	O_R3	O_R2	O_R1	P_R
Включен				Включен
Выключен	x			Включен
Выключен	x	x		Выключен
Выключен	x		x	Выключен
Выключен	x	x	x	Выключен

выключает P_R , а связываясь с O_R3 , выключает P_{RM} . Эти данные вместе с данными о порядке связывания с разными участками O_R (рис. 1.23) позволяют судить об основных физиологических состояниях оператора, связанного с Cго. Соответствующие сведения приведены в табл. 4.5.

Белок Cro *in vitro* [32, 62, 63]

Cго образует стабильный димер, и нет никаких данных, что он состоит более чем из одного домена; об этом же свидетельствуют результаты рентгеноструктурного анализа (рис. 2.9). Эксперименты по футпринтингу показывают, что Cго связывается некооперативно с тремя участками O_R и с тремя участками O_L . По сродству к Cго участки O_R располагаются в порядке, указанном на рис. 1.23, т. е. $O_R3 > O_R2 = O_R1$, а участки O_L - в порядке $O_L1 > O_L2 = O_L3$. В 0,2 М КСl при 37°C Cго связывается с O_R3 так же прочно, как димер репрессора с O_R1 . Сродство Cго к O_R2 и O_R1 примерно на порядок ниже, чем к O_R3 .

Cго блокирует транскрипцию с промотора P_R , но только при добавлении его в смесь, содержащую ДНК, до полимеразы. Для проявления такого эффекта Cго должен связаться с участками O_R1 и O_R2 , а удаление участка O_R3 никак не сказывается на подавлении P_R . При введении до полимеразы Cго блокирует транскрипцию с P_{RM} независимо от того,

содержит ли матрица нормальные участки $O_R 1$ и $O_R 2$, несущие репрессор, или используется мутантная матрица $P_{RM} Up - 1$. Этот вид репрессии не проявляется, если участок $O_R 3$ мутантен и Sto не может с ним связаться.

**Белок Rec A расщепляет репрессор
и тем самым запускает индукцию
(рис. 1.21) [16, 36, 57, 59]**

После индукции в лизогенных клетках дикого типа расщепленный репрессор можно обнаружить в клеточных экстрактах. Необходимым условием расщепления являются УФ-облучение и наличие продукта гена *rec A*. Если клетка-хозяин повреждена, так что ген *rec A* инактивирован, репрессор не расщепляется и индукция фага становится невозможной. В случае клеток, несущих некоторые мутантные формы гена *rec A*, УФ-облучение в определенных условиях может не понадобиться: индукция лизогенов в этом случае происходит просто при повышении температуры, без всякого облучения.

Расщепление репрессора можно провести *in vitro* с помощью очищенного белка Rec A. λ -Репрессор расщепляется между остатками Ala и Gly в положениях 111 и 112; этот процесс стимулируется короткими одноцепочечными фрагментами ДНК и АТФ.

Некоторые другие репрессоры, в том числе репрессор фага 434 и белок Lex A, также можно расщепить *in vitro*, причем и в этих случаях расщепление происходит между остатками Ala и Gly, расположенными в пептиде, соединяющем два домена. При pH 10 эти репрессоры могут расщепляться по указанной связи и спонтанно; при pH 7,0 реакция идет медленно, но значительно ускоряется в присутствии очищенного белка Rec A.

Степень расщепления репрессора в лизогенных клетках определяют в опытах по связыванию с фильтрами. Расщепления 30% молекул недостаточно, чтобы вызвать эффективную индукцию, для этого необходимо, чтобы расщепилось 80% молекул репрессора.

**Связывание Sto с $O_R 3$
запускает механизм переключения
(рис. 1.24) [5]**

Связывание Sto с $O_R 3$ играет ключевую роль в индукции. Об этом свидетельствуют следующие два эксперимента.

В первом из них использовали фаг λ , мутантный по $O_R 3$, с которым не может связываться Sto . Такой фаг дает обычные по виду мутные бляшки, но содержащие его лизогенные клетки очень слабо индуцируются при УФ-облучении. Это означает,

что для эффективной индукции необходимо, чтобы C_{80} связывался с $O_R 3$.

В ходе второго эксперимента использовали плазмиду, детерминирующую синтез C_{80} под контролем *lac*-репрессора. Эту плазмиду вводили в одном случае в лизогенные клетки дикого типа, а в другом – в лизогенные клетки, мутантные по $O_R 3$. Когда синтез C_{80} индуцировали добавлением ИПТГ, происходила индукция только лизогена дикого типа, но не мутантного лизогена. Таким образом, связывание C_{80} с $O_R 3$ запускает индукцию.

Репрессор и C_{80} связываются с оператором так, как это показано на рис. 2.6, 2.8 и 2.10

Эти рисунки иллюстрируют не только идентичность конфигурации представленных комплексов, но и то, что именно аминокислоты, расположенные в узнающих спиралах (а также в «руках» λ -репрессора), определяют специфичность связывания с данной последовательностью. Эти два близких аспекта исследуют с помощью рентгеноструктурного анализа и биохимических экспериментов.

Рентгеноструктурный анализ [13, 14, 17, 40, 49]

Структура N-концевых доменов репрессора и C_{80} в кристаллах установлена с высоким разрешением. Как видно из рисунков гл. 2, имеет место структурное соответствие между ними и В-формой ДНК. Согласно пространственной модели еще одного специфического ДНК-связывающего белка *E. coli*, белка – активатора катаболизма (БАК), контакт между ним и ДНК тоже осуществляется посредством биспирального элемента, описанного в гл. 2. Во всех случаях одна из α -спиралей (узнающая) укладывается в большой желобок, а другая располагается поперек него. Адекватность этих моделей ДНК-белковых комплексов подтверждают результаты рентгеноструктурного анализа комплекса репрессора с оператором в кристаллах. В состав исследованного комплекса входил репрессор фага 434, близкородственного фагу λ ; о нем уже шла речь в этой книге.

В составе комплекса репрессора с оператором фага 434 два N-концевых домена связываются с одним операторным участком, который в данном случае имеет длину 14 пар оснований. Узнающая спираль каждого из доменов встраивается в большой желобок, а предшествующий участок α -спирали располагается поперек него. В целом структуры N-концевых доменов репрессора 434 и λ на удивление сходны. Так, α -спиральные участки 2 и 3 репрессоров λ и 434, образующие универсальный

ДНК-связывающий биспиральный элемент, в точности совпадают по своей пространственной конфигурации, а спиральные участки 1 (этот участок в репрессоре фага 434 короче) и 4 почти совпадают. ДНК находится в В-форме; некоторые отклонения наблюдаются лишь на концах операторного участка. Возможно, это связано с тем, что репрессор 434 слегка изгибает оператор.

Получение и свойства «гибридных спиралей»
[9, 38, 52, 60, 65, 66]

Узнающая спираль репрессора 434, которая располагается в большом желобке ДНК в комплексе репрессора с оператором, – важнейший, а возможно, и единственный элемент, определяющий специфичность связывания. Это следует из эксперимента, в котором структура репрессора 434 была модифицирована с целью изменения его специфичности. Мы называем этот эксперимент получением «гибридных» или «химерных» спиралей, хотя, возможно, правильнее было бы говорить о «конструировании» спиралей. Схема эксперимента изображена на рис. 4.25.

Идея его состояла в том, чтобы заменить аминокислотные остатки, расположенные на наружной стороне узнающей спирали репрессора 434, остатками, которые занимают аналогичные положения в другом репрессоре – фага P22, инфицирующего *Salmonella*. При этом аминокислотные остатки на внутренней стороне спирали оставались прежними. Что считают наружной, а что внутренней сторонами узнающей спирали, разъяснено в гл. 2. Мы надеялись, что гибридная цепочка аминокислот образует α -спиральный участок, который займет нормальное положение относительно остальной части молекулы репрессора 434 и будет взаимодействовать с оператором фага P22, но не фага 434. Обычные репрессоры фагов P22 и 434 не обладают никаким сродством к «чужим» операторам ни *in vitro*, ни *in vivo*. Операторный участок P22 имеет длину 22 пары оснований; последовательность участка $O_R 1$ фага P22 представлена вместе с последовательностью оператора 434 на рис. 4.25.

В верхней части рис. 4.26 показано расположение аминокислот на поверхности узнающих спиралей репрессоров 434 и P22, а в нижней – предполагаемое расположение аминокислот в искусственной узнающей спирали. Искусственный репрессор был сконструирован на основе репрессора 434 путем замены части его гена синтетическим фрагментом ДНК, кодирующим новую узнающую спираль. Модифицированный ген репрессора 434 присоединили к эффективному промотору. Клетки, содержащие такую конструкцию в составе плазмиды, продуцируют большое количество нужного белка.

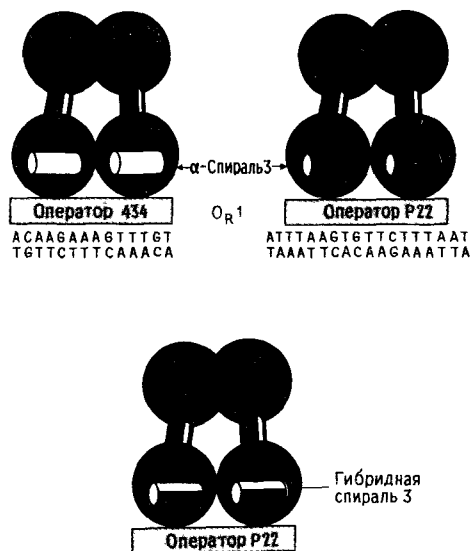


Рис. 4.25. Получение «гибридных» спиралей. Аминокислоты, расположенные на наружной стороне узнающей спирали репрессора 434, заменены аминокислотами, занимающими аналогичное положение в репрессоре P22.

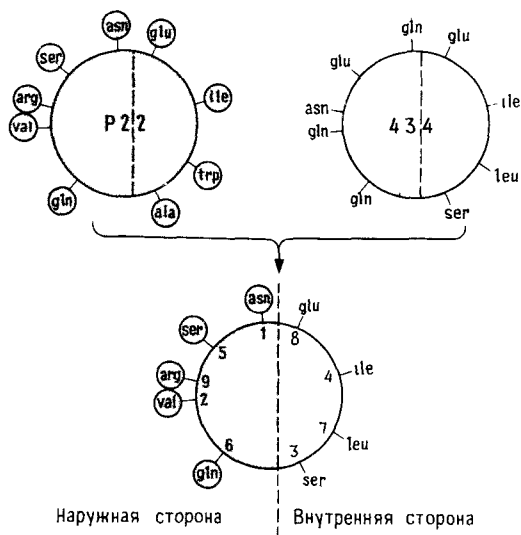


Рис. 4.26. Узнающие α -спирали, используемые в опытах по созданию «гибридной» спирали. Три узнающие спирали изображены на рисунке так, что их ось оказывается перпендикулярной плоскости рисунка. Сравнение с рис. 2.3 показывает, что боковые группы аминокислот, лежащих на «наружной» поверхности, направлены в сторону ДНК.

Удивительный результат этого эксперимента состоял в том, что новый белок связывался с операторами P22, но не с операторами фага 434 как *in vivo*, так и *in vitro*. Поэтому клетки, содержавшие этот белок, были устойчивы к заражению фагами P22, но не 434, а очищенный белок связывался с тремя участками O_R фага P22 с таким же сродством и в том же порядке, как и репрессор фага P22 дикого типа. Этот эксперимент доказывает, что все структурные элементы специфичности, по которым различаются два репрессора, сосредоточены только на наружной стороне узнающих спиралей.

Роль «рук» λ -репрессора
[21, 48, 64]

Структура комплекса операторов с репрессором, имеющим N-концевые «руки» подобно λ -репрессору, не исследована методом рентгеноструктурного анализа, поэтому нам приходится судить о функции «рук» на основании более косвенных данных. Эксперименты по защите от метилирования под действием ДМС показывают, что «руки» образуют специфические контакты со звеньями G в большом желобке на задней стороне спирали (рис. 4.16). При связывании с $O_R 1$ репрессор или его N-концевой домен защищает от метилирования семь гуаниновых звеньев. Атомы N7 пяти из этих звеньев, которые подвергаются метилированию, расположены в большом желобке на передней стороне двойной спирали, а два атома N7 в положениях 8 и 9 «смотрят» в большой желобок на задней стороне.

Если удалить аминокислотные остатки 1–3 из интактного репрессора путем конструирования нового гена или из его N-концевого домена с помощью расщепления папаином, образуются репрессоры, которые защищают от метилирования голько G, расположенные на передней стороне спирали. Удаление трех концевых звеньев приводит к уменьшению связывания интактного во всем остальном репрессора с оператором в 30 раз, а при удалении шести звеньев средство уменьшается по крайней мере на три порядка.

Генетические эксперименты также указывают, что «руки» репрессора образуют как минимум один специфический контакт с задней стороной ДНК. Так, наличие мутации в $O_R 1$ по положению 8 снижает сродство репрессора, имеющего нормальные «руки», но не влияет на репрессор, лишенный трех N-концевых остатков. Таким образом, «руки» вносят свой вклад как в энергию, так и в специфичность связывания. Исследования свободного, т.е. не связанного с оператором, репрессора с помощью ЯМР показывают, что «руки» имеют гибкую, подвижную конформацию.

Построение детальных моделей взаимодействия репрессора и *Сго*, основанных на данных об их структуре, позволяет предположить, какие контакты возникают между узнающими спиралями и парами оснований оператора. Одно из затруднений на этом пути состоит в том, чтобы установить точное взаимное пространственное расположение α -спирали и ДНК. Например, на рис. 2.11 предполагается, что *Ser* в положении 2 α -спиралей обоих белков контактирует с основанием в положении 4 оператора, а *Lys* в положении 6 контактирует с основаниями в положениях 5 и 6. Согласно более ранней модели, α -спираль *Сго* сдвинута так, что *Ser* и *Lys* контактировали соответственно с основаниями в положениях 3, 4 и 5 оператора. Простое рассмотрение моделей не позволяет решить, какой из вариантов расположения спирали правильный и соответствует ли вообще какой-либо из них действительности.

Эксперимент, в котором использовали специально сконструированные мутантные белки и метилирование с помощью ДМС, частично подтвердил модель, изображенную на рис. 2.11, а именно что *Ser* в положении 2 узнающей спирали взаимодействует с основанием в положении 4 оператора. Нуклеотидные последовательности генов репрессора и *Сго* модифицировали таким образом, чтобы они кодировали мутантные белки. Оба мутанта содержали в положении 2 узнающей спирали *Ala* вместо более объемного и совершенно иного по своей химической природе остатка *Ser*. Мутантные *Сго* и репрессор получили в очищенном виде и использовали в опытах *in vitro*. Было проведено сравнение мутантных белков с белками дикого типа по их способности защищать ДНК от метилирования. Этот эксперимент в принципе аналогичен опыту с использованием этилнитрозомочевины (см. ранее). Он состоит в том, что вначале проводят метилирование оператора при помощи ДМС так, чтобы на одну молекулу ДНК приходилась одна метильная группа, а затем добавляют репрессор или *Сго*. Операторные фрагменты, связавшиеся с белком, задерживаются на нитроцеллюлозном фильтре, и метилированные основания в них идентифицируют с помощью расщепления и гель-электрофореза (ср. этот подход с тем, который проиллюстрирован на рис. 4.15). Если метилирование какого-либо основания препятствует связыванию белка, полоса в геле, соответствующая определенному положению в операторе, отсутствует.

Этот эксперимент показал, что метилирование *G* в положении 4 оператора подавляет связывание репрессора и *Сго* дикого типа, но не оказывает никакого действия на связывание мутантных белков. Оба мутантных белка связываются слабее,

чем их аналоги дикого типа, но метилирование основания в положении 4 не влияет на связывание мутантных белков. Метилирование же других оснований оператора подавляет связывание как мутантных белков, так и белков дикого типа.

**Репрессор активирует транскрипцию гена cI ,
связываясь с $O_R 2$ и контактируя с полимеразой
своим N-концевым доменом
(рис. 1.12, 1.19, и 2.17)**

Мутации, нарушающие позитивную регуляцию
[24, 25, 27, 52]

Для объяснения механизма стимуляции транскрипции каким-либо ДНК-связывающим регуляторным белком можно предложить две гипотезы. Согласно первой, связывающийся белок каким-то образом меняет конформацию ДНК, и она становится более подходящим субстратом для РНК-полимеразы. Вторая модель, наоборот, предполагает, что связанный белок стимулирует транскрипцию, контактируя с полимеразой. Против первой модели существует одно возражение: как мы и предполагали, по данным рентгеноструктурного анализа λ -репрессор очень мало изменяет конформацию ДНК при связывании. Еще один аргумент против этой модели был получен при изучении мутантов по гену репрессора, которые обозначаются pc (от англ. *positive control* – позитивная регуляция).

Мутантные репрессоры pc нормально связываются с ДНК, но не могут активировать транскрипцию; такие мутанты были выделены и в случае λ -репрессора, и в случае репрессора фага P22. Во всех случаях мутации затрагивают аминокислотные остатки, которые, как предполагается на основании структурных исследований и других данных, расположены вблизи от полимеразы и, возможно, соприкасаются с ней. Таким образом, данные по этим мутантам служат дополнительным подтверждением справедливости наших представлений о комплексах репрессоров с операторами в тех двух случаях, о которых идет речь.

На рис. 4.27 указаны фосфатные группы, которые предположительно контактируют с полимеразой, связанной с P_{RM} , и с λ -репрессором, связанным с $O_R 2$ и $O_R 1$. Когда эти белки исследуют по отдельности, и с λ -репрессором, связанным с $O_R 2$, и с полимеразой контактирует один фосфат. Следовательно, этот фосфат расположен скорее всего вблизи от участка взаимодействия между двумя указанными белками. Если мы поместим димер репрессора на $O_R 2$, то обнаружим, что измененные аминокислотные остатки всех pc -мутантов λ -репрессора расположены на том участке поверхности, кото-



Рис. 4.27. Расположение λ -репрессора на операторных участках O_{R1} и O_{R2} и полимеразы на P_{RM} . Боковая поверхность двойной спирали ДНК изображена в виде плоскости, чтобы показать все фосфаты, контактирующие с полимеразой в области P_{RM} и с репрессором в области O_{R1} и O_{R2} . (Футпринтинг при участии ДНКазы показывает, что полимеразы занимает более протяженный участок ДНК, чем можно судить по контактам с этими фосфатами. Мы всюду изображаем полимеразу с учетом этого факта.)

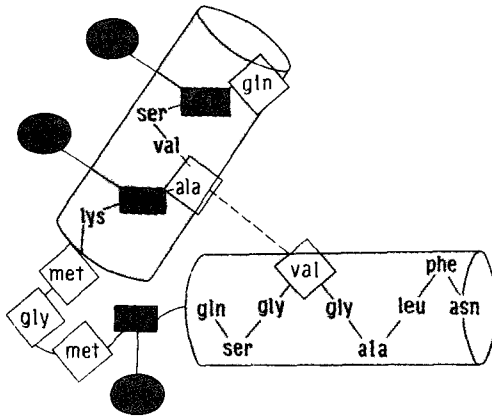


Рис. 4.28. Мутации фага λ_{rc} . Три аминокислоты, которые замещают соответствующие остатки в белке дикого типа, в трех мутантах λ_{rc} обведены кружками. Остатки, заключенные в ромбики, сохраняются в составе биспиральных элементов многих специфических ДНК-связывающих белков. Обратите внимание, что rc -мутации не затрагивают ни консервативные остатки, ни остатки узнающей спирали.

рый, если судить по положению общего с полимеразой фосфата, обращен к полимеразе (см. рис. 2.17).

Как видно из рис. 4.28, мутации λ_{rc} приводят к изменению узнающего ДНК биспирального элемента белка и затрагивают остатки одной из спиралей и области поворота, но не изменяют остатки узнающей спирали. На этом основании с учетом некоторых дополнительных соображений можно вы-

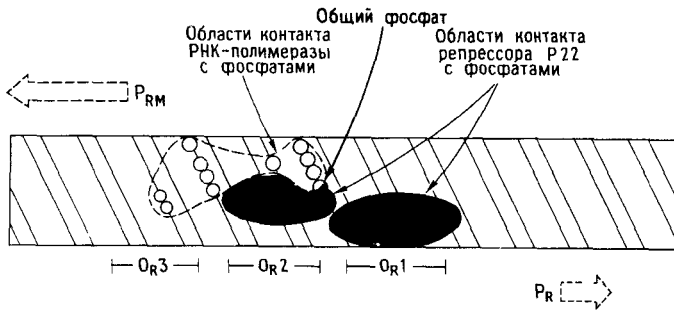


Рис 4.29 Связывание репрессора P22 с участками O_{R1} и O_{R2} и полимеразы с P_{RM} . Сравните этот рисунок, на котором показаны фосфаты O_R и P_{RM} фага P22, контактирующие с белками, с рис. 4.27.

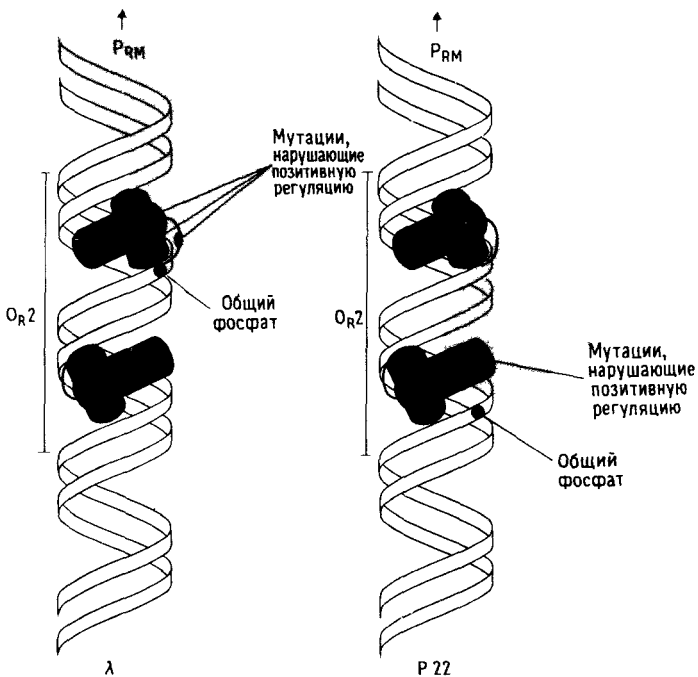


Рис 4.30 Положение «общего фосфата», контактирующего с полимеразой и репрессором, относительно биспиральных элементов репрессоров фагов λ и P22. Как и можно было ожидать исходя из различия в расположении этих репрессоров относительно полимеразы, связанной с P_{RM} , *ps*-мутации у репрессоров фагов λ и P22 локализованы на разных поверхностях.

сказать предположение относительно механизма взаимодействия репрессора P22 с полимеразой.

На рис. 4.29 показано, как располагаются репрессор P22 на участках $O_R 1$ и $O_R 2$ и полимеразы на P_{RM} . Данные получены путем идентификации фосфатов, контактирующих с белками. Обратите внимание, что λ -репрессор и полимеразы расположены вдоль ДНК друг за другом, как вагоны поезда, а репрессор P22 и соответствующая полимеразы лежат на ДНК рядом друг с другом, образуя подобие бутерброда (не забудьте, что на рисунке показана плоская развертка цилиндрической поверхности двойной спирали). Обратите также внимание, что имеется единственный «общий» фосфат, с которым контактируют и репрессор P22, и полимеразы.

Если судить только по тому набору фосфатов, с которыми контактирует полимеразы, «общий» фосфат располагается в промоторе P22 так же, как и в промоторе P_{RM} фага λ . Что же касается репрессора, относительно него «общий» фосфат располагается по-иному, чем в случае фага λ . Хотя нам неизвестна структура репрессора P22, мы все-таки знаем, какой участок его аминокислотной последовательности образует предполагаемый ДНК-узнающий биспиральный элемент. Из рис. 4.30 видно, что если репрессор P22 касается полимеразы какой-либо частью биспирального элемента вблизи «общего» фосфата, то в этом должны участвовать остатки С-концевой части узнающей спирали. Эта ситуация совершенно отлична от случая с λ -репрессором, который изображен на том же рисунке и в котором остатки, затронутые мутациями *pc*, располагаются вблизи N-конца узнающей спирали.

Некоторые *pc*-мутации репрессора P22 затрагивают сам С-конец узнающей спирали, а другие (если исходить из соображений о структурной гомологии белков) – участок поблизости от С-конца. Отсюда следует, что оба белка, осуществляющих позитивную регуляцию, должны связываться с одной и той же поверхностью РНК-полимеразы, но участвуют в этом разные поверхности репрессоров (рис. 4.30). По всей вероятности, существенно, что все пять выделенных к настоящему времени *pc*-мутаций у репрессоров λ и P22 состоят в замене аминокислоты в белке дикого типа на более основную аминокислоту (при этом увеличивается положительный заряд).

Исследования очищенных репрессоров, содержащих *pc*-мутации, показали, что они нормально или близко к этому связываются с ДНК, подавляют P_R , но неспособны активировать P_{RM} .

Позитивная регуляция in vitro [43]

Репрессор увеличивает эффективность транскрипции с P_{RM} примерно в 10 раз. Этот эффект легко наблюдать, только если

концентрация полимеразы не превышает определенного уровня; при высокой концентрации полимеразы P_{RM} эффективно работает как в присутствии, так и в отсутствие репрессора. Именно этого следует ожидать, если роль репрессора заключается в увеличении частоты взаимодействия полимеразы с P_{RM} .

По данным футпринтинга максимальная активация P_{RM} под действием репрессора наблюдается при такой его концентрации, когда он заполняет только участки $O_R 1$ и $O_R 2$. При более высокой концентрации заполняется также $O_R 3$, и P_{RM} подавляется. Если промотор содержит мутантные $O_R 1$ и $O_R 2$ или если мутантен только $O_R 2$, никакой стимуляции P_{RM} под действием репрессора не наблюдается. Если мутантны $O_R 1$ и $O_R 3$, стимуляция P_{RM} возможна, но она происходит при более высокой концентрации репрессора, чем в случае интактного участка $O_R 1$. Напомним, что, если $O_R 1$ несет мутацию, $O_R 2$ слабее связывает репрессор. Выделенный N-концевой домен репрессора также стимулирует P_{RM} и *in vivo*, и *in vitro*; в этом случае эффект не зависит от того, несет ли $O_R 1$ мутацию. Напомним, что N-концевой домен связывается некооперативно.

Результаты экспериментов, описанных в предыдущих разделах, согласуются с представлением о том, что репрессор, связанный в $O_R 2$, стимулирует P_{RM} , контактируя с полимеразой, связанной с этим промотором. Однако здесь возникает следующее возражение. Возможно, полимеразы, находящаяся на P_R , влияет на связывание полимеразы с P_{RM} и репрессор стимулирует P_{RM} по той простой причине, что препятствует связыванию полимеразы с P_R . Такая «модель конкурирующей полимеразы» может быть отвергнута с помощью различных экспериментов. Например, удаления P_R с помощью делеции оказывается недостаточно, чтобы активировать P_{RM} ; более того, делеция вообще не сказывается на активности P_{RM} как *in vivo*, так и *in vitro*. Другой эксперимент показывает, что в случае матрицы $O_R 2^-$ не наблюдается сколько-нибудь заметной стимуляции P_{RM} .

Репрессор, связанный с $O_R 1$, препятствует связыванию полимеразы с P_R на той же матрице, но не действует на P_{RM} . Более того, в случае матрицы, лишенной P_R и $O_R 1$, связывание полимеразы с P_{RM} увеличивает сродство репрессора и даже его изолированного N-концевого домена к $O_R 2$.

Заключение

В предисловии к этой книге мы отмечали, что многие приведенные в ней рисунки не просто иллюстрируют отдельные наблюдения. Чаще всего (и особенно это относится к гл. 1) они суммируют и интерпретируют множество разных экспери-

ментов. Читатель, который справился с гл. 4, в полной мере оценит это.

Такой читатель заметит, например, что нам пришлось выдумать изображения мономеров и димеров интактного репрессора. Действительно ли мономер похож на гантель? Правильно ли мы изобразили, как димеры репрессора «наклоняются», соприкасаясь с другими димерами и обеспечивая тем самым кооперативность связывания? Можно ли объяснить гибкостью цепочки, соединяющей домены репрессора, следующий довольно странный факт: при изменении расстояния между соседними участками связывания в O_R и O_L на несколько пар оснований энергия взаимодействия между димерами репрессора почти не изменяется (-2 ккал/моль)? Эти вопросы представляют особый интерес в свете совершенно неожиданного открытия, изложенного в приложении 3: репрессоры кооперативно связываются с операторными участками, искусственно разделенными шестью витками двойной спирали, причем энергия взаимодействия примерно такая же, как и в случае близко расположенных участков. Мы предполагаем, что взаимодействия между ДНК-связывающими регуляторными белками играют важную роль в регуляции генов у всех организмов, и нам предстоит узнать много нового о механизмах этих взаимодействий.

Если структура репрессора нам известна хотя бы частично, то о структуре РНК-полимеразы мы не знаем практически ничего. Идея о том, что репрессор действует как активатор транскрипции благодаря белок-белковым контактам, — лишь первый шаг в интерпретации всего механизма. Все ли белки *E. coli*, активирующие полимеразу, связываются с одним и тем же ее участком? Каким образом эти контакты помогают полимеразе связаться с ДНК и начать транскрипцию? Эти вопросы привлекают широкий интерес, поскольку недавно было обнаружено, что аминокислотные последовательности двух субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* в значительной степени гомологичны последовательностям субъединиц эукариотических РНК-полимераз [11].

Как отмечалось в гл. 3, мы лишь начинаем понимать во всех деталях, каким образом регуляторные белки узнают определенные нуклеотидные последовательности ДНК. Хотя нам известно, какие функции выполняют белки N и Q фага λ , мы почти ничего не знаем об их структуре и поэтому имеем слабое представление о механизмах их действия. Нам известно, какие белки участвуют в других этапах роста фага λ , например в интеграции и эксцизии, а также в репликации и рекомбинации, но и в этих случаях наши знания о механизмах процессов весьма скудны. Поскольку наша цель состоит в установлении механизмов всех этих процессов на молекуляр-

ном уровне, следует признать, что мы находимся лишь в начале пути

Литература

Обзоры

- 1 *Chadwick P Pirrotta V Steinberg R Hopkins N Ptashne M* The λ and 434 phage repressors, Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, **35**, 283 294 (1970)
- 2 *Gussin G Johnson A Pabo C Sauer R* Repressor and Cro protein structure, function, and role in lysogenization. In *Lambda II*, R W Hendrix, J W Roberts, F W Stahl, and R Weisberg, eds, New York, Cold Spring Harbor, pp 93 123, 1983
- 3 *Jacob F Monod J* Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins, J Mol Biol, **3**, 318 356 (1961)
- 4 *Johnson A D Pabo C O Sauer R T* Bacteriophage λ repressor and Cro protein interaction with operator DNA, Methods in Enzymology **65** 839 856, (1980)
- 5 *Johnson A D Poteete A R Lauer G Sauer R T Ackers G K Ptashne M* λ repressor and Cro components of an efficient molecular switch, Nature **294**, 217 233 (1981)
- 6 *Lewis M Jeffrey A Wang J Ladner R Ptashne M Pabo C O* Structure of the operator-binding domain of λ repressor implication for DNA recognition and gene regulation, Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, **47**, 435 440, 1983
- 7 *Lwoff A* Lysogeny Bact Rev, **17**, 269–337 (1953)
- 8 *Miller J H* The lacI gene its role in lac operon control and its use as a genetic system In *The Operon*, J H Miller and W S Reznikoff, esd, New York, Cold Spring Harbor, pp 31 89, 1978
- 9 *Wharton R P Ptashne M* An α -helix determines the DNA-binding specificity of a repressor, Trends in Biochemical Sciences, **11**, 71 73 (1986)

Оригинальные статьи

- 10 *Ackers G K Shea M A Johnson A D* Quantitative model for gene regulation by λ phage repressor, Proc Natl Acad Sci USA, **79**, 1129 1133 (1982)
- 11 *Allison L A Moyle M Shales M Ingles C J* Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases, Cell, **42**, 599 610 (1985)
- 12 *Amann E Brosius J Ptashne M* Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *E coli*, Gene, **25**, 167 178 (1983)
- 13 *Anderson W F Ohlendorf D H Takeda Y Matthews B W* Structure of the *cro* repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA, Nature, **290**, 754 758 (1981)
- 14 *Anderson J E Ptashne M Harrison S C* The structure of a phage repressor-operator complex at 7 Å resolution, Nature, **316**, 596 601 (1985)
- 15 *Backman K Ptashne M* Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro, Cell, **13**, 65 71 (1978)
- 16 *Baulone A Levine A Devoret R* Inactivation of prophage λ repressor in vivo, J Mol Biol, **131**, 553 572 (1979)
- 17 *Bushman F D Anderson J E Harrison S C Ptashne M* Ethylation interference and X-ray crystallography identify similar interactions between 434 repressor and operator, Nature, **316**, 651 653 (1985)

- 18 *Ebright R H* Proposed amino acid-base pair contracts for 13 sequence specific DNA-binding proteins In *Protein Structure, Folding, and Design*, D Oxender, ed., New York, Alan R Liss 1986
- 19 *Fchols H Green L Oppenheim B Oppenheim A Honigman A* Role of the *cro* gene in bacteriophage λ development *J Mol Biol*, **80**, 203 216 (1973)
- 20 *Eiscn H Brachet P Pereira da Silva L Jacob F* Regulation of repressor expression in λ , *Proc Natl Acad Sci USA*, **66**, 855 862 (1970)
- 21 *Ehason J Weiss M A Ptashne M* NH₂-terminal arm of phage λ repressor contributes energy and specificity to repressor binding and determines the effects of operator mutations *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 2339 2343 (1985)
- 22 *Folkmanis A Takeda Y Smuth J Gussin G Echols H* Purification and properties of a DNA-binding protein with characteristics expected for the Cro protein of bacteriophage λ a repressor essential for lytic growth *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2249 2253 (1976)
- 23 *Galas D J Schmitz A* DNase footprinting a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity, *Nucl Acids Res*, **5**, 3157 3170 (1978)
- 24 *Guarente L Nye J S Hochschild A Ptashne M* A mutant λ repressor with a specific defect in its positive control function, *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**, 2236 2239 (1982)
- 25 *Hawley D K McClure WR* The effect of a λ repressor mutation on the activation of transcription initiation from the λP_{RM} promoter, *Cell*, **32**, 327 333 (1983)
- 26 *Hecht M H Nelson H C M Sauer R T* Mutations in λ repressor's amino-terminal domain implications for protein stability and DNA-binding, *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 2676 2680 (1983)
- 27 *Hochschild A Irwin N Ptashne M* Repressor structure and the mechanism of positive control, *Cell*, **32** 319 325 (1983)
- 28 *Hochschild A Ptashne M* The recognition helices of λ repressor and λ *cro* make homologous contact with the λ operator, *Cell*, **44**, 925 933 (1986)
- 29 *Humayun Z Jeffrey A Ptashne M* Completed DNA sequences and organizations of repressor-binding sites in the operators of phage λ , *J Mol Biol*, **112**, 265 277 (1977)
- 30 *Humayun Z Klein D Ptashne M* Sites of contact between λ operators and λ repressor, *Nucl Acids Res*, **4**, 1595 1607 (1977)
- 31 *Johnson A* Interaction between a repressor and Cro and the λ operator, *J Mol Biol*, (1986) (in press)
- 32 *Johnson A Meyer B J Ptashne M* Mechanism of action of the Cro protein of bacteriophage λ , *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**, 1783 1787 (1978)
- 33 *Johnson A D Meyer B J Ptashne M* Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the λ phage repressor, *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 5061 5065 (1979)
- 34 *Kaiser A D* Mutations in a temperate bacteriophage affecting its ability to lysogenize *Escherichia coli*, *Virology*, **3**, 42 61 (1957)
- 35 *Kaiser A D Jacob F* Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization, *Virology*, **4**, 509 521 (1957)
- 36 *Little J W* Autogestation of LexA and phage λ repressors, *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 1375 1379 (1984)
- 37 *Maniatis T Ptashne M* Multiple repressor binding in the operators of bacteriophage λ , *Proc Natl Acad Sci USA*, **70**, 1531 1535 (1973)
- 38 *Matthews B W Ohlendorf D H Anderson WF Takeda Y* Structure of the DNA binding region of *lac* repressor inferred from its homology with *cro* repressor, *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**, 1428 1432 (1982)

- 39 Maurer R Meyer B J Ptashne M I O_R3 and autogenous negative control by repressors, *J Mol Biol* **139** 147 161 (1980)
- 40 McKey D Weber I Steitz T Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å-resolution, *J Biol Chem*, **257**, 9518 9524 (1982)
- 41 Meyer B J Kleid D G Ptashne M λ repressor turns off transcription of its own gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, **72** 4785-4789 (1975)
- 42 Meyer B J Maurer R Ptashne M II O_R1 , O_R2 , and O_R3 their roles in mediating the effects of repressor and *cro* *J Mol Biol*, **139**, 163 194 (1980)
- 43 Meyer B J Ptashne M III λ repressor directly activates gene transcription *J Mol Biol* **139**, 195 205 (1980)
- 44 Neubauer Z Calef E Immunity phase-shift in defective lysogens nonmutational hereditary change of early regulation of λ prophage, *J Mol Biol*, **51**, 1 13 (1970)
- 45 Ogata R Gilbert W DNA-binding site of *lac* repressor probed by dimethylsulfate methylation of *lac* operator, *J Mol Biol*, **132**, 709 728 (1979)
- 46 Ohlendorf D H Anderson W F Fisher R G Takeda Y Matthews B W The molecular basis of DNA-protein recognition inferred from the structure of *cro* repressor *Nature* **298** 718 723 (1982)
- 47 Oppenheim A B Neubauer Z Calef E The antirepressor a new element in the regulation of protein synthesis, *Nature*, **226** 31 32 (1970)
- 48 Pabo C O Krowatyn W Jeffrey A Sauer R T The N terminal arms of λ repressor wrap around the operator DNA, *Nature* **298**, 441 443 (1982)
- 49 Pabo C O Lewis M The operator-binding domain of λ repressor structure and DNA recognition, *Nature*, **298**, 443 447 (1982)
- 50 Pabo C O Sauer R T Sturtevant J M Ptashne M The λ repressor contains two domains, *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 1608 1612 (1979)
- 51 Pirrotta V Chadwick P Ptashne M Active form of two coliphage repressors *Nature*, **227** 41 44 (1970)
- 52 Poteete A R Ptashne M Control of transcription by the bacteriophage P22 repressor, *J Mol Biol*, **157**, 21 48 (1982)
- 53 Ptashne M Isolation of the λ phage repressor, *Proc Natl Acad Sci USA*, **57** 306 313 (1967)
- 54 Ptashne M Specific binding of the λ phage repressor to λ DNA *Nature*, **214**, 232 234 (1967)
- 55 Riggs A D Suzuki H Bourgeois S Lac repressor-operator interaction, *J Mol Biol*, **48**, 67-83 (1970)
- 56 Roberts T M Kacich R Ptashne M A general method for maximizing the expression of a cloned gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 760 764 (1979)
- 57 Roberts J W Roberts C W Mount D W Inactivation and proteolytic cleavage of phage λ repressor in vitro in an ATP-dependent reaction, *Proc Natl Acad Sci USA* **74** 2283 2287 (1977)
- 58 Sauer R T Pabo C O Meyer B J Ptashne M Backman K D Regulatory functions of λ repressor reside in the amino terminal domain, *Nature* **279** 396 400 (1979)
- 59 Sauer R T Ross M J Ptashne M Cleavage of the λ and P22 repressors by *recA* protein, *J Biol Chem*, **257**, 4458 4462 (1982)
- 60 Sauer R T Yocum R R Doolittle R F Lewis M Pabo C O Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure *Nature*, **298**, 447 451 (1982)
- 61 Siebenlist A Gilbert W Contacts between *Escherichia coli* RNA polymerase and an early promoter of phage T7, *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**, 122-126 (1980)
- 62 Takeda Y Specific repression of in vitro transcription by the Cro repressor of bacteriophage λ , *J Mol Biol*, **127**, 177 189 (1979)

- 63 Takeda Y, Folkmanis A, Echols H Cro regulatory protein specified by bacteriophage λ , J Biol Chem, **252**, 6177-6183 (1977)
- 64 Weiss M A, Elason J L, States D J Dynamic filtering by two-dimensional ^1H NMR with application to phage λ repressor, Proc Natl Acad Sci USA, **81**, 6019-6023 (1984)
- 65 Wharton R P, Brown E L, Ptashne M Substituting an α -helix switches the sequence specific DNA interactions of a repressor, Cell, **38**, 361-369 (1984)
- 66 Wharton R P, Ptashne M Changing the binding specificity of a repressor by redesigning an α -helix, Nature, **316**, 601-605 (1985)

Приложение 1

Конструирование белка, эффективно связывающегося с ДНК

Цель последующего обсуждения – проиллюстрировать с помощью некоторых примеров, какие факторы определяют эффективность связывания белка, узнающего ДНК, со своим операторным участком в клетке. Для удобства мы будем говорить о конкретном белке – λ -репрессоре, хотя основные положения носят общий характер. Более глубокое и детальное обсуждение проблемы можно найти в статьях, перечисленных в конце этого приложения.

Резюме

Доля времени, в течение которого оператор бывает связан с репрессором, определяется двумя факторами: сродством репрессора к оператору и концентрацией репрессора, доступного для взаимодействия с оператором. При данном уровне сродства чем выше концентрация репрессора, тем выше степень заполнения оператора. Количество свободного репрессора в клетке может значительно уменьшаться за счет его взаимодействия с неоператорными участками. Один из способов увеличения эффективности специфического связывания репрессора состоит в том, чтобы вместо одного операторного участка использовать два или более участков, с которыми репрессор связывается кооперативно.

Специфическое и неспецифическое связывание

Рассмотрим культуру бактериальных клеток, которые содержат одинаковое число молекул репрессора и один оператор. Какая часть операторов связана с репрессором в каждый данный момент времени? Будем рассматривать наши клетки так, как будто они представляют собой одну большую клетку, в которой концентрация операторов и репрессоров такая же, как в отдельных клетках.

В равновесии взаимодействие репрессоров и операторов

характеризуется константой диссоциации K_{OP} , которая определяется как

$$OR \rightleftharpoons O + R, \quad K_{OP} = \frac{[R][O]}{[OR]}, \quad (1)$$

где $[R]$ и $[O]$ – концентрация несвязанных (свободных) репрессора и оператора соответственно, $[OR]$ – концентрация комплексов репрессор – оператор.

Чтобы оценить долю операторов, занятых репрессором при данной концентрации последнего, выведем уравнение, которое прямо даст нам долю операторов, свободных от репрессора. Пусть $[O_T]$ – суммарная концентрация оператора, $[O]$ – концентрация свободного оператора, $[OR]$ – концентрация связанного оператора; тогда $[O_T] = [O] + [OR]$. Подставляя выражение для $[OR]$ из уравнения (1), получаем

$$\frac{[O]}{[O_T]} = \frac{K_{OP}}{K_{OP} + [R]} \approx \frac{K_{OP}}{[R]} \text{ при } [R] \gg K_{OP}. \quad (2)$$

Посмотрим теперь, как выполняется это уравнение, на реальном примере. Пусть в одной клетке *E. coli* содержится 100 копий репрессора. Тогда его концентрация составляет примерно 10^{-7} М. Концентрация одного оператора в клетке равна примерно 10^{-9} М. Константу равновесия K_{OP} примем равной 10^{-10} М.

Репрессор находится в большом избытке по отношению к оператору, поэтому $[R] \approx [R_T]$, где $[R_T]$ – суммарная концентрация репрессора в клетке. Кроме того, $[R_T] \gg K_{OP}$, и мы можем использовать упрощенную форму уравнения (2):

$$\frac{[O]}{[O_T]} \approx \frac{K_{OP}}{[R_T]} \approx \frac{10^{-10}}{10^{-7}} \approx 10^{-3}. \quad (3)$$

Отсюда следует, что в каждый данный момент времени 99,9% всех операторов занято репрессором. Или, другими словами, каждый оператор занят 99,9% времени.

Приведенные вычисления не учитывают тот факт, что белки, которые прочно связываются со специфическими операторными участками, обладают также низким, но все же не пренебрежимо малым сродством к неоператорным участкам ДНК. Такое связывание с неспецифическими последовательностями ДНК может приводить к заметному снижению концентрации свободного репрессора и, следовательно, доли связанных операторов. Далее мы всюду будем считать, что репрессор обладает одинаково низким сродством к любому неоператорному участку ДНК. В действительности может оказаться, что в неспецифическом связывании участвуют главным образом последовательности, которые отчасти напоминают оператор, но это не повлияет на наши основные выводы.

Константа равновесия K_D для взаимодействия репрессора с неоператорными участками ДНК определяется как

$$DR \rightleftharpoons D + R, \quad K_D = \frac{[D][R]}{[DR]}, \quad (4)$$

где $[D]$ – концентрация свободных от репрессора неоператорных участков, $[DR]$ – концентрация комплексов репрессора с такими участками.

Чтобы оценить долю репрессора, связанного с неоператорными участками, заметим, что если $[R_T]$ – суммарная концентрация репрессора, то

$$[R_T] = [R] + [DR] + [OR] \approx [R] + [DR].$$

Подставив выражение для $[DR]$ из уравнения (4), получим

$$\frac{[R]}{[R_T]} = \frac{K_D}{K_D + [D]} \approx \frac{K_D}{[D]} \text{ при } [D] \gg K_D. \quad (5)$$

Пусть для нашего репрессора $K_D = 10^{-4}$ М (это вполне разумная величина). Концентрация неспецифических участков связывания в бактериальной клетке равна примерно 10^{-2} М. Длина бактериальной ДНК составляет $\sim 10^7$ пар оснований, и в своих оценках мы полагали, что каждая пара оснований представляет собой начало нового неспецифического участка. Число неспецифических участков всегда много больше числа молекул репрессора, поэтому мы можем считать, что $[D] = [D_T]$, где $[D_T]$ – суммарная концентрация неспецифических участков. Тогда в соответствии с уравнением (5) имеем

$$\frac{[R]}{[R_T]} \approx \frac{10^{-4}}{10^{-2}} \approx 10^{-2}. \quad (6)$$

Отсюда следует, что 99% нашего репрессора в клетке не находятся в свободном виде в растворе, а связаны с неспецифическими участками и, следовательно, недоступны для связывания с оператором. Это в свою очередь означает, что доля операторов, связанных с репрессором, будет в действительности более чем в 100 раз ниже величины, вычисленной по формуле (3).

Итак, эффективность связывания репрессора с оператором определяется двумя величинами: K_D/K_{OP} и $[R_T]/[D_T]$. В нашем примере при увеличении отношения сродства репрессора к операторной и неоператорной ДНК в 100 раз (т.е. при увеличении в 100 раз величины K_D/K_{OP}) доля свободных от репрессора операторов уменьшится примерно в 100 раз. Чтобы получить результат в общем виде, подставим в уравнение (2) выражение для $[R]$, полученное из соотношения (5). После преобразований получим

$$\frac{[O]}{[O_T]} \approx \frac{K_{OP}[D_T]}{K_D[R_T]}.$$

Считается, что по крайней мере некоторые специфически связывающиеся с ДНК белки в бактериальной клетке большей частью связаны с ДНК неспецифическим образом, а не находятся в свободном виде в растворе. Этот вопрос трудно решить количественно, поскольку остается ряд неопределенностей: например, *in vitro* сродство репрессора к оператору и к неспецифической ДНК изменяется на несколько порядков при не очень больших изменениях температуры и ионной силы, близких к физиологическим значениям. При этом точные ионные условия внутри клетки нам неизвестны.

Увеличение специфичности

Представим теперь гипотетический репрессор с таким отношением сродства к специфическим и неспецифическим участкам ДНК, что при данной концентрации он заполняет оператор всего на 1%. Каким образом можно увеличить эффективность связывания до 99%?

Увеличение концентрации белка

Как мы уже отмечали, для этого понадобится увеличить концентрацию белка в 100 раз.

Повышение специфичности

Белок можно модифицировать таким образом, чтобы отношение эффективности специфического и неспецифического связывания увеличилось. Рассмотрим два подхода к решению этой задачи.

● Сродство к специфическим участкам увеличивается, а к неспецифическим остается прежним. В какой мере возможна такая модификация типичных репрессоров прокариот – неизвестно. Скорее всего какого-то результата удастся достичь, введя один-два дополнительных специфических контакта между узнающими участками белка и функциональными группами ДНК.

● Отношение эффективности специфического и неспецифического связывания увеличится и в том случае, если увеличить в равной степени число специфических и неспецифических контактов.

Пусть некий репрессор связывается с оператором с $K_{op} = 10^{-10}$ М, а со случайными последовательностями ДНК – с $K_D = 10^{-4}$ М. Теперь *удвоим* размеры репрессора и оператора, так чтобы они образовывали вдвое больше специфических и неспецифических контактов. Константы связывания более крупного белка с операторными и неспецифическими участками ДНК будут в первом приближении составлять

$K_{OP} = 10^{-20}$ М и $K_D = 10^{-8}$ М. (Удвоение числа контактов означает, что удваивается энергия $-\Delta G$; напомним, что K связано с ΔG экспоненциально: $K = e^{-\Delta G/RT}$. При изменении ΔG на 2,8 ккал/моль K меняется в 100 раз.)

Обратите внимание, что, удвоив размеры репрессора и оператора, мы увеличили отношение эффективностей специфического и неспецифического связывания с 10^6 до 10^{12} . Другими словами, величина K_D/K_{OP} возросла в 10^6 раз. Итак, наш анализ показывает, что более крупный репрессор работает гораздо эффективнее, чем небольшой по размеру. Однако теперь мы сталкиваемся с *кинетической* проблемой: абсолютное значение константы неспецифического связывания настолько велико, а неспецифических мест так много, что репрессоры практически все время связаны с ними. В результате равновесие между специфическими и неспецифическим связыванием достигается слишком долго.

Суть кинетической проблемы состоит в том, что репрессор, связанный с участком с $K_D = 10^{-8}$ М, остается на этом участке около 0,1 с. Эта оценка основана на измерении скорости диссоциации комплексов различных репрессоров с операторами. Мы уже говорили, что в *E. coli* имеется примерно 10^7 неспецифических участков. Даже если только 10% этих участков будет связано с репрессором, он будет оставаться на них более 25 ч, что примерно в 10 раз больше времени генерации типичной бактериальной клетки.

Итак, мы приходим к выводу, что наш гипотетический репрессор двойного размера не сможет найти свой оператор за время генерации. В состоянии равновесия репрессор действительно будет связан с оператором, но равновесие никогда не будет достигнуто.

Существует, по-видимому, и еще одна проблема, связанная с репрессором двойного размера. Величина константы диссоциации $K_{OP} = 10^{-20}$ М означает, что, однажды связавшись с оператором, белок остается на нем практически до бесконечности. Никакой механизм индукции или любой другой клеточный процесс, для которого необходимо, чтобы комплекс репрессора с оператором спонтанно диссоциировал, не сработает в течение сколько-нибудь разумного промежутка времени. Поскольку энергия связывания так велика, для удаления репрессора с оператора необходима радикальная перестройка конформации белка.

Использование кооперативности

Попытаемся ввести в систему кооперативность. Встроим еще один оператор рядом с первым, а репрессор сконструируем таким образом, чтобы его молекулы, связанные с этими операторами, взаимодействовали между собой.

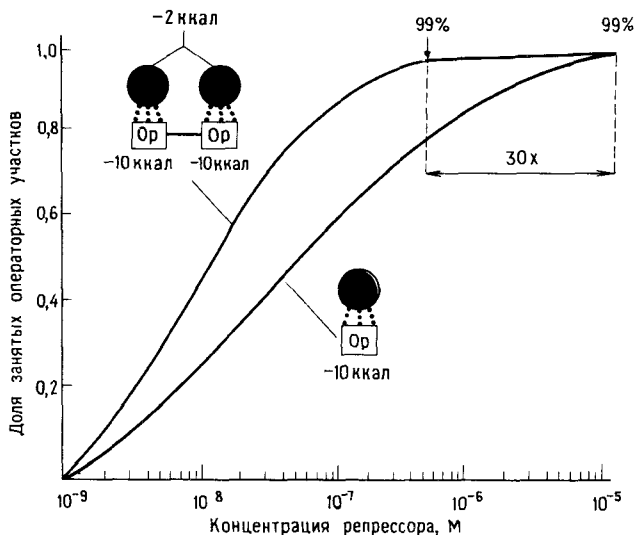


Рис А 1 Чтобы заполнить одиночные операторные участки на 99% необходимо в 30 раз больше репрессора, чем для заполнения двойного оператора, с которым репрессор связывается кооперативно. Если продолжить приведенные кривые, то мы увидим, что для заполнения на 99,9% потребуется уже в 100 раз больше репрессора. При построении кривых предполагалось, что сродство репрессора к каждому операторному участку при независимом связывании составляет -10 ккал/моль и энергия взаимодействия между двумя связанными репрессорами в случае оператора, состоящего из двух участков связывания, в которой энергия взаимодействия составляет -5 ккал/моль, то по сравнению с первой системой количество репрессора, необходимое для заполнения 99 и 99,9% участков, будет еще в 40 и 100 раз ниже соответственно. Модель с двумя участками, использованная в данном случае, примерно соответствует заполнению операторных участков O_{R2} и O_{R3} фага λ (в отсутствие функционального O_{R1}), а модель с одним участком — заполнению одиночного участка O_{R3} . (Кривая для модели с двумя участками построена для случая заполнения одного из них, но, поскольку участки заполняются практически одновременно, это мало влияет на форму кривой.)
Кривые были построены С. Джонсоном (см. работу Ackers et al., 1982).

Кривые, приведенные на рис. А.1, иллюстрируют увеличение эффективности связывания репрессора за счет кооперативного связывания с двумя участками. При построении кривых предполагалось, что энергия связывания репрессора с единственным участком составляет -10 ккал/моль, а при связывании с соседними участками энергия взаимодействия молекул репрессора составляет примерно -2 ккал/моль. Из рисунка следует, что в рамках кооперативной модели для заполнения 99% мест связывания необходимо примерно в 30 раз меньше репрессора, чем при некооперативном связывании. Для заполнения 99,9% мест в случае одного участка необходимо примерно в 100 раз

больше репрессора, чем при наличии двух участков.

Как уже говорилось в гл. 1, λ -репрессор связывается с матрицей кооперативно. Если бы λ -оператор состоял только из участка O_R1 или O_R2 , концентрация репрессора, характерная для лизогенных клеток, обеспечивала бы заполнение этих двух участков лишь на 90 и на 10% соответственно. Однако взаимодействие между соседними связанными молекулами репрессора, энергия которого достигает по оценкам -2 ккал/моль, повышает уровень заполнения O_R1 и O_R2 в лизогенных клетках до величины более 99%.

Благодаря кооперативности фактически увеличивается отношение эффективностей специфического и неспецифического связывания. Вероятность связывания двух молекул репрессора на соседних неспецифических участках пренебрежимо мала, поскольку таких участков очень много. В случае фага λ два связанных с ДНК димера репрессора взаимодействуют слабо и ДНК-белковые комплексы легко диссоциируют. В других случаях между связанными с ДНК белками могут возникать более прочные связи, и в них может участвовать несколько разных белков. Такие взаимодействия обеспечат образование весьма стабильных комплексов даже при условии, что сродство изолированных белковых молекул к ДНК сходно со сродством λ -репрессора к его оператору. Один из примеров такого рода рассмотрен в приложении 3.

ДНК-белковые взаимодействия у эукариот

Ядро эукариотической клетки гораздо крупнее, чем бактериальная клетка, и содержит намного больше ДНК. Поэтому белку, специфически связывающемуся с ДНК, приходится выбирать свой оператор из гораздо большего числа неспецифических последовательностей, чем в случае бактерий. Возникают ли при этом какие-либо особые проблемы? Рассмотрим один пример, для которого можно получить простой ответ.

Представим эукариотическое ядро, в котором содержится один λ -оператор. Пусть объем ядра и содержание в нем ДНК в 500 раз превышают объем и количество ДНК в бактерии. Другими словами, суммарная концентрация ДНК в эукариотическом ядре и в бактериальной клетке одинакова. Отсюда прямо следует, что если концентрация λ -репрессора в эукариотическом ядре такая же, как в бактерии, т. е. оно содержит в 500 раз больше репрессора, или примерно 10 000 молекул, то λ -репрессор с таким же успехом найдет свой оператор в эукариотическом ядре, как и в случае бактериальной клетки. (Вообразим небольшой объем эукариотического ядра, равный объему бактериальной клетки и содержащей оператор. В этих двух случаях способность репрессора связываться с оператором должна быть одинакова.)

Эта простая модель в некоторых случаях оказывается весьма близкой к реальной ситуации. Действительно, концентрация ДНК в ядрах некоторых эукариот близка к таковой для бактерий. Кроме того, как указано в приложении 3, в тех немногих случаях, когда удалось измерить сродство эукариотических регуляторных белков к операторам, оно казалось близким к соответствующей величине для λ -репрессора и его оператора.

Приводя эту гипотетическую упрощенную модель, мы намеревались дать читателю отправную точку в размышлениях над ответом на вопрос, поставленный в начале раздела. В конкретных системах концентрации эукариотических регуляторных белков могут оказаться ниже, чем нам пришлось предположить, а концентрация ДНК — выше. Оба фактора затруднят поиск оператора соответствующим регуляторным белком, но это затруднение можно преодолеть с помощью кооперативного связывания.

Литература: оригинальные статьи

- 1 Ackers G K Johnson A D Shea M A Quantitative model for gene regulation by λ phage repressor, Proc Natl Acad Sci USA, **79**, 1129-1133 (1982)
- 2 Johnson A D Potteete A R Laur G Sauer R T Ackers G K Ptashne M λ repressor and *cro* components of an efficient molecular switch, Nature, **294**, 217-223 (1981)
- 3 Lin S Riggs A D The general affinity of lac repressor for *E. coli* DNA: implications for gene regulation in prokaryotes, Cell, **4**, 107-111 (1985)
- 4 Nelson H C M Sauer R T Lambda repressor mutations that increase the affinity and specificity of operator binding, Cell, **42**, 549-558 (1985)
- 5 Von Hippel P H Revzin A Gross C A Wang A C Non specific DNA-binding of genome regulating proteins as a biological control mechanism. I the *lac* operon equilibrium aspects Proc Natl Acad Sci USA, **71**, 4808-4812 (1974)
- 6 Yamamoto K R Alberts B The interaction of estradiol receptor protein with the genome: an argument for the existence of undetected specific sites, Cell, **4**, 301-310 (1975)

Приложение 2

Сильные и слабые взаимодействия

Взаимодействия компонентов переключателя генов фага λ относятся к двум типам: сильные и слабые. Энергия ДНК-белковых взаимодействий составляет $-10 - -15$ ккал/моль, что соответствует K_D примерно 10^{-10} М, а энергия белок-белковых взаимодействий примерно на порядок меньше и соответствует равновесным константам диссоциации порядка 10. Репрессор, связанный с O_R1 , помогает другому репрессору связаться с O_R2 , а тот в свою очередь помогает полимеразе связаться с P_{RM} и начать транскрипцию. Но в обоих случаях эффект составляет величину $\sim -1 - -2$ ккал/моль, что на порядок меньше энергии прямых ДНК-белковых взаимодействий.

Одно из последствий этого различия состоит в том, что при исследованиях *in vitro* эффект такого рода слабых взаимодействий часто не обнаруживается. Например, если просто определять интенсивность транскрипции с P_{RM} при высокой концентрации полимеразы, она оказывается максимальной и стимулирующее действие репрессора не выявляется. Возьмем другой пример. Если удалить O_R1 и O_R3 , репрессор при высокой концентрации будет связываться с O_R2 , и сложится впечатление, что O_R1 не имеет отношения к этому связыванию. В обоих случаях вместо увеличения концентрации белка в экспериментах *in vitro* можно понизить концентрацию соли и таким образом увеличить константу связывания. Интерпретация подобных экспериментов осложняется тем, что внутриклеточные условия *in vivo* (концентрации взаимодействующих компонентов, ионная сила, рН и т. д.) в точности неизвестны.

Если при изучении той или иной регуляторной системы ставится задача выяснить роль всех важнейших компонентов, может оказаться полезным проверить полученные *in vitro* результаты в экспериментах *in vivo*, как это было сделано при изучении фага λ .

Приложение 3

Единый механизм регуляции транскрипции у эукариот и прокариот

Известен ряд генов эукариот, которые отличаются от генов фага λ следующим удивительным свойством: транскрипция каждого из этих генов активируется белком, который связывается на расстоянии нескольких сотен пар оснований от места инициации транскрипции. Такие гены найдены у человека, грызунов и дрожжей.

Рассмотрим в качестве примера дрожжевой ген *GAL1* – один из генов, обеспечивающих рост дрожжей на галактозе. Примерно за 250 пар оснований до этого гена расположен участок, который обозначается UAS_G (от англ. *Upstream Activating Sequence* – последовательность, активирующая ген *GAL* и расположенная до него). Связавшись с UAS_G , белок *GAL4* запускает транскрипцию, идущую с начальной точки гена *GAL1*. Если поместить UAS_G за целых 600 пар оснований до другого дрожжевого гена, этот ген включится под действием *GAL4*. Как осуществляется такое дальное действие? Следует ли нам использовать те данные, которые были получены при изучении фага λ , или мы должны привлекать новые идеи?

При изучении фага λ были выяснены два основополагающих молекулярных механизма, обеспечивающих действие белков – активаторов транскрипции. Первый из них описывает взаимодействие регуляторных белков с ДНК, второй – активацию транскрипции гена под действием регуляторного белка, связанного с ДНК. Мы утверждаем, что оба этих механизма приложимы к регуляции экспрессии генов у других организмов, в том числе у эукариот.

Во-первых, регуляторные белки узнают специфические последовательности оснований в ДНК благодаря взаимодействию комплементарных поверхностей. В тех случаях, которые были подробно рассмотрены в этой книге, белки содержат выступающие α -спирали, которые располагаются в большом желобке ДНК и образуют специфические контакты с экспонированными химическими группами ДНК. Нам известно, как узнает ДНК еще один белок. В данном случае речь идет не о регуляторе транскрипции, а о ферменте, который расщепляет ДНК по строго определенным последовательностям. Этот

бактериальный белок Eso R1 содержит выступающие α -спирали, которые укладываются в большие желобки молекулы ДНК. В деталях механизм узнавания отличается от описанных нами примеров, но, как и в случае λ -репрессора, конформация белка в целом комплементарна конформации обычной двухцепочечной ДНК. Хотя при связывании этого белка конформация спирали несколько нарушается, никаких радикальных изменений не происходит.

Некоторые эукариотические регуляторные белки, в том числе GAL 4, удалось выделить и показать, что они связываются *in vitro* со специфическими последовательностями ДНК. Хотя у нас нет полного представления о том, как эти белки взаимодействуют с ДНК, нет никаких оснований полагать, что они используют при этом какие-либо другие приспособления помимо структур, выступающих из белковой глобулы и комплементарных обычной двойной спирали ДНК. В тех случаях, когда удалось измерить сродство этих белков к их операторным участкам, оно оказалось сравнимым со сродством λ -подобных регуляторных белков к их операторам. Аминокислотные последовательности некоторых белков (но не всех) позволяют предположить, что при узнавании они используют биспиральный элемент, подобный таковому в белках фага λ . В одном случае при связывании регуляторного белка генов теплового шока *Drosophila* он кооперативно связывается с двумя соседними участками ДНК. При этом энергетика связывания на удивление близка к связыванию λ -репрессора с O_R1 и O_R2 , что, по-видимому, является простым совпадением. Еще один случай – активаторы транскрипции 5S-генов, кодирующих небольшую РНК *Xenopus laevis*. Здесь несколько белков, каждый из которых обладает примерно таким же сродством к ДНК, как и λ -репрессор, кооперативно связываются и образуют комплекс, который остается стабильным практически до бесконечности (см. работы [1, 2, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22]).

Во-вторых, связанные с ДНК активаторы транскрипции включают ген, соприкасаясь с другими белками. Например, связанный с ДНК λ -репрессор активирует транскрипцию, вступая в контакт с РНК-полимеразой и помогая ей связаться с прилегающим промотором и начать транскрипцию. Можно представить себе альтернативный механизм, согласно которому белок изменяет структуру ДНК в месте связывания и вблизи него.

Если бы механизм активации заключается в изменении структуры ДНК, это изменение должно было бы каким-то образом распространяться до участка начала транскрипции. Такое изменение структуры области начала транскрипции в свою очередь необходимо для связывания РНК-полимеразы и начала транскрипции.

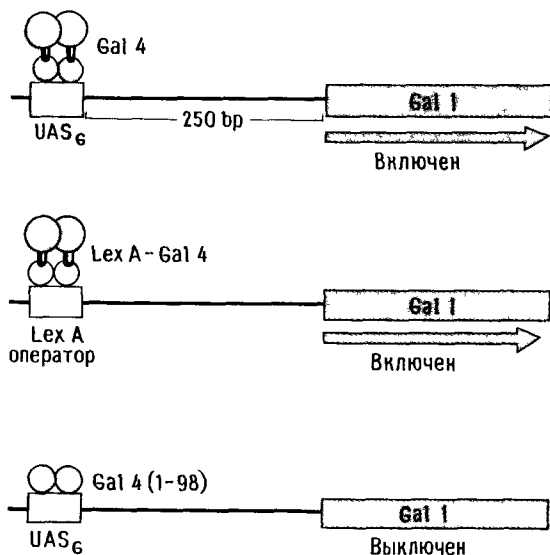


Рис А 2. Три эксперимента по изучению регуляции генов у дрожжей. Вверху белок GAL 4, связываясь с участком UAS_G , включает транскрипцию гена $GAL1$, которая начинается за 250 bp до него. Предполагается, что белок GAL4 состоит из двух доменов, один из которых, N-концевой, контактирует с ДНК. В середине действие гибридного белка, содержащего в качестве С-концевого домена белок GAL4 и N-концевого – бактериальный репрессор LexA. Такой белок, LexA-GAL4, связывается с оператором $lexA$, встроенным перед дрожжевым геном, и включает этот ген. Внизу N-концевой домен GAL4 тоже способен связываться с участком UAS_G , но не может включать транскрипцию. Рисунок существенно упрощает ситуацию: здесь не учтено, что UAS_G состоит из четырех участков связывания GAL4. Связывается ли GAL4 в виде димера и состоит ли он только из двух доменов, неизвестно.

Однако мы уже говорили о том, что при связывании репрессора с ДНК не происходит никаких радикальных изменений ее структуры. Более того, мутации, в результате которых изменяются аминокислоты на соответствующей поверхности репрессора и подавляется его стимулирующая активность (так называемые *pc*-мутации), не оказывают никакого действия на связывание с ДНК. Существование таких *pc*-мутантов подтверждает, что само по себе связывание репрессора с ДНК недостаточно для активации гена.

Недавно мы провели эксперименты (их иллюстрирует рис. А.2), показавшие, что, как и λ -репрессор, белок GAL4 выполняет две разные функции: связывается с ДНК и осуществляет позитивную регуляцию. Более того, в этом последнем случае их можно разграничить.

● Белок GAL 4 был модифицирован: его N-концевые остатки были заменены N-концевым доменом бактериального

репрессора Lex A. В общих чертах белок Lex A напоминает λ -репрессор, и его N-концевой домен взаимодействует с *lex A*-оператором. Гибридный белок, который можно синтезировать в дрожжевых клетках, связывается с оператором *lex A*, но не с UAS_G . Если встроить *lex A*-оператор перед каким-либо дрожжевым геном, белок свяжется с ним и включит транскрипцию этого гена. Немодифицированный репрессор Lex A, который тоже можно синтезировать в дрожжевых клетках, такого действия не оказывает.

● Был сконструирован белок – производный GAL 4, аналогичный *pc*-мутантным формам λ -репрессора. Он состоит просто из 98 N-концевых аминокислот GAL 4 и связывается с четырьмя участками UAS_G длиной по 17 пар оснований, но не способен активировать транскрипцию. И здесь, как и в случае λ -репрессора, одного связывания с ДНК недостаточно для активации гена.

Наши эксперименты с GAL 4 показывают, что, связываясь с ДНК, он, подобно λ -репрессору, инициирует транскрипцию, соприкасаясь с какой-то другой молекулой, по-видимому с другим белком. Каким же образом GAL 4, связанный с UAS_G , может активировать процесс, который начинается на расстоянии нескольких сотен пар оснований? Возможно, GAL 4 помогает какому-то белку связаться рядом с собой. Этот белок может раскручивать ДНК, и таким образом область вблизи начала гена становится более доступной для связывания других белков и полимеразы. Альтернативная возможность состоит в том, что этот белок связывается рядом с GAL 4, а затем каким-то образом перемещается вдоль спирали по направлению к началу гена, где он сам начинает транскрипцию или помогает связыванию полимеразы.

Я придерживаюсь другой точки зрения. Суть ее в том, что GAL 4, связанный с UAS_G , вступает в непосредственный контакт с другим белком, связанным с областью начала транскрипции, и таким образом помогает РНК-полимеразе связаться и начать транскрипцию. Согласно этой гипотезе, ДНК между UAS_G и началом гена образует петлю, возможно заполненную другими белками. Для этого ДНК должна быть достаточно гибкой, чтобы соприкосновение удаленных друг от друга белков не требовало больших энергетических затрат.

Один из вариантов предлагаемой модели состоит в том, что во взаимодействии между GAL 4 и вспомогательным регуляторным белком, связанным вблизи начала транскрипции, участвуют один или более дополнительных белков. Благодаря этому ДНК может изгибаться в меньшей степени.

Известен ряд примеров бактериальных регуляторных белков, изгибающих двойную спираль ДНК. В этих случаях ДНК частично наматывается на эти белки. Мы предполагаем, что λ -репрессор изгибает двойную спираль другим способом.

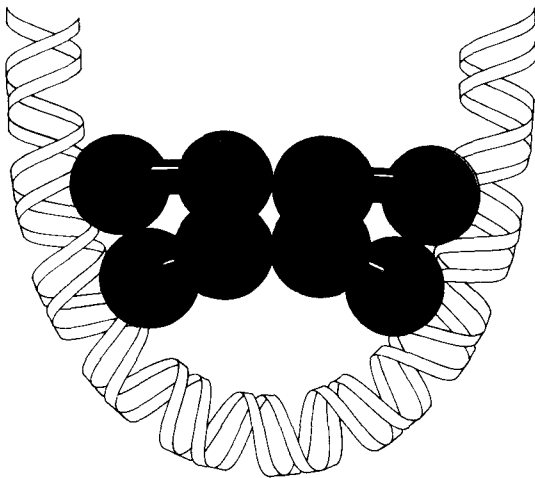


Рис. А.3. Проявление кооперативного эффекта на расстоянии. Димеры λ -репрессора связываются с двумя участками ДНК, которые разделены шестью витками двойной спирали. Молекула ДНК плавно изгибается, и С-концевые домены репрессоров приходят в соприкосновение.

Представим себе два операторных участка, один из которых обладает меньшим сродством к репрессору, чем другой (например, $O_R 1$ и $O_R 2$), и разделенных пятью или шестью витками спирали (имеется в виду расстояние между центрами операторных участков). Репрессор кооперативно связывается с этими участками — точно так же, как и в случае, когда они находятся на обычном расстоянии в два витка. Другими словами, сродство к участку слабого связывания увеличивается, если в составе той же ДНК имеется участок сильного связывания. Как и в случае, когда участки сближены, выделенные N-концевые домены связываются некооперативно.

Эксперименты с λ -репрессором позволяют предположить, что димеры связываются кооперативно с двумя удаленными друг от друга участками, ДНК изгибается и С-концевые домены сближаются (рис. А.3). Картина нуклеазного расщепления ДНК между двумя участками при связывании репрессоров указывает, что молекула приобретает плавный изгиб. Репрессоры не могут взаимодействовать, если они расположены на противоположных сторонах спирали, например разделены 4,5 или 5,5 витками. По нашему мнению, это связано с тем, что энергия, необходимая для изгибания ДНК до соприкосновения димеров, в этом случае слишком велика.

Как ни странно, известно три случая, когда бактериальные регуляторные белки кооперативно связываются *in vivo* с участками, разделенными несколькими сотнями пар оснований.

Эксперименты, в которых изменяли расстояние между участками, показали, что связывание белков на одной и той же стороне двойной спирали благоприятствует взаимодействию, особенно если участки связывания расположены сравнительно близко друг к другу. Кажется весьма привлекательным предположение о том, что эти два явления – кооперативность при связывании удаленных друг от друга бактериальных регуляторных белков *in vivo* и кооперативность между молекулами λ -репрессора *in vitro* – имеют общий механизм. Взаимодействия, которые зависят от гибкости ДНК, пока мало изучены. Такие взаимодействия, особенно на больших расстояниях, может облегчать сверхспирализация ДНК, поскольку ДНК при этом закручена сама на себя (см. работы [3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18]).

Взаимодействие удаленных друг от друга белков позволяет многим белкам, связываемым с ДНК, влиять на транскрипцию одного гена. Это весьма гибкая система: взаимодействующие регуляторные белки не обязательно должны занимать строго определенное положение друг относительно друга или относительно начала регулируемого гена. Кроме того, поскольку поверхность регуляторного белка, которая взаимодействует с другими белками, отлична от поверхности, контактирующей с ДНК, могут существовать белки с разной специфичностью связывания с ДНК, но с одинаковыми поверхностями, участвующими в белок-белковых взаимодействиях. С другой стороны, может оказаться, что есть белки, которые связываются с одними и теми же участками на ДНК, но поверхности, участвующие во взаимодействии с другими белками, у них различаются.

Конечно, как и в случае фага λ , репрессор мог бы занимать некий важный участок ДНК и препятствовать связыванию другого белка. Такому связыванию в свою очередь может способствовать взаимодействие с другим репрессором, расположенным вблизи от первого или на некотором расстоянии от него. В другом случае связанный на расстоянии репрессор мог бы взаимодействовать с потенциальным активатором, препятствуя таким образом его продуктивному взаимодействию с еще одним белком, необходимым для активации гена. Наконец, репрессор мог бы препятствовать взаимодействию двух других связывающихся с ДНК белков, располагаясь между ними.

Литература: оригинальные статьи

1. *Bogenhagen D F Wormington W M Brown D D* Stable transcription complexes of *Xenopus* 5S RNA genes a means to maintain the differentiated state *Cell*, **28**, 413-421 (1982)
2. *Bram R J Kornberg R D* Specific protein binding to far upstream activating sequences in polymerase II proteins, *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 43-47 (1985)
3. *Brent R Ptashne M* A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene, *Nature*, **312**, 613 616 (1984)
4. *Brent R Ptashne M* A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a procaryotic repressor, *Cell*, **43**, 729-736 (1985)
5. *Brown D D* The role of stable complexes that repress and activate eukaryotic genes *cell*, **37** 359-365 (1984)
6. *Dandanell G Herman K* Two operators separated by 599 base pairs are required for *deoR* repression of the *deoR* operon of *Escherichia coli*, *EMBO J*, **4**, 3333-3338 (1985)
7. *Dunn T Hahn S Ogden S Schlieff R* An *araBAD* operator at -280 base pairs that is required for *PBAD* repression addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression, *Proc Natl Acad Sci USA*, **81** 5017 5020 (1984)
8. *Frederick C A Grable J Mehta M Samudzi C Jen-Jacobson L Wang B C Greene P Boyer H W Rosenberg J M* Kinked DNA in crystalline complex with *EcoRI* endonuclease *Nature*, **309**, 327 331 (1984)
9. *Gidoni D Kadonaga J T Barrera-Saldona H Takahashi K Chambon P Tjian R* Bidirectional *SV40* transcription mediated by tandem *Sp1* binding interactions *Science* **230**, 511 517 (1985)
10. *Giniger E Varnum S M Ptashne M* Specific DNA-binding of *GAL4* a positive regulatory protein of yeast, *Cell*, **40**, 767 774 (1980)
11. *Hochschild A H Ptashne M* Cooperative binding of lambda repressors to sites separated by integral turns of the DNA helix, *Cell*, **44**, 681 687 (1986)
12. *Hope I A Struhl K* *GCN4* protein synthesized in vitro, binds *H153* regulatory sequences implications for general control of amino acid biosynthetic operons in yeast, *Cell*, **43**, 177 188 (1985)
13. *Irani M H, Orosz L, Adhya S* A control element within a structural gene the *GAL* operon of *Escherichia coli* **32**, 783 788 (1983)
14. *Johnson A Herskowitz I* A repressor (*MAT a2* product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast, *Cell*, **42**, 237-247 (1985)
15. *Jones K A Yamamoto K R Tjian R* Two distinct transcription factors bind to the *HSV* thymidine kinase promoter in vitro, *Cell*, **42**, 559 572 (1985)

- 16 *Keeqan L Gull G Ptashne M* Separation of DNA-binding from the transcription-activation function of a eukaryotic regulatory protein, *Science*, **231**, 699-704 (1986)
- 17 *Lassar A B Martin P L Roeder R G* Transcription of class III genes formation of preinitiation complexes, *Science*, **222**, 740-748 (1983)
- 18 *Majumdar A Sankar A* Demonstration of two operator elements in gal, *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 6100-6104 (1984)
- 19 *Myers R M Khqman M Tjian R* Does simian virus 40 antigen unwind DNA? *J Biol Chem*, **256**, 10156-10160 (1981)
- 20 *Sawadogo M Roeder R G* Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region, *Cell* **43**, 165-171 (1985)
- 21 *Takahashi K Vigneron M Metthes H Wildeman A Zenke M Chambon P* Stereospecific alignments are required for initiation from the SV40 early promoter *Nature*, **319**, 121-126 (1985)
- 22 *Topol J Ruden D M Parker C S* Sequences required for in vitro transcriptional activation of a *Drosophila* hsp 70 gene, *Cell*, **42**, 527-537 (1985)

Предметный указатель

- Аминокислоты 15, 26, 27, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 120, 121, 122, 123, 127
- Антиммунность (фактор Ai или Tof) 115. *См. также* Белок Cro
- Антитерминатор 69. *См. также* Белок N и Белок Q
- Бактерии, конъюгация** 87, 88
- ферменты 21, 25, 35, 63, 72, 74, 75, 89
 - хромосома 75, 88
- Белки, денатурация 94, 95, 96
- регуляторные 17, 18, 39, 42, 49, 55, 58, 60, 81, 89, 90, 124, 129, 141, 143 148
 - укладка 15, 27, 46, 94
- Белок БАК 82, 89, 119
- CI *с.и.* Репрессор фага λ
 - CII 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 86, 87
 - CIII 69, 72, 86, 87
 - Cro 19, 22, 23, 24, 25, 27 28, 29, 36, 37, 49–50, 69, 73, 76, 114–119
 - выделение 116
 - димеры 27, 28, 35, 36, 50, 117
 - как негативный регулятор 25, 36–39, 69, 114–119
 - мутанты 123–124
 - связывание с ДНК (O_R) 18, 22, 28, 37, 41, 43, 50, 51, 55, 105–106, 114 119, 123
 - узнающая спираль 50 55, 119, 123 *in vivo* 116–117
- Белок Eco R1 144
- GAL4 144–146. *С.и. также* Участок UAS_G
- Int 65, 71, 73–76
 - LexA 19, 77, 118, 145, 146
 - N 67, 68, 69, 77, 129. *С.и. также* Антитерминатор
 - Q 19, 69, 70, 71, 73, 79, 129. *С.и. также* Антитерминатор
 - RecA 19, 34, 35, 40, 77, 81, 118
 - Xis 67, 73, 74. *С.и. также* Фаг λ , вырезание
- Белок-белковые взаимодействия 28
- 33, 37–40, 41, 58–60, 107–108, 111 114, 123, 124–129, 138–140, 146 148. *С.и. также* Кооперативность, Репрессор, РНК-полимераза
- Бензпирен 77
- Биспиральный элемент 49, 50, 55, 120, 125, 126, 127. *С.и. также* Репрессор и Белок Cro, узнающая спираль
- Бляшки 84–85, 87, 115, 118
- Bacillus megaterium* 22
- β -Галактозидаза 89, 109, 110
- Гель-фильтрация 96
- Гель-электрофорез 95, 102, 123
- Гемоглобин 39
- Ген алкогольдегидрогеназы дрозофилы 82
- головки фага 62–65, 69
 - cI 19, 23, 24, 58, 61, 62, 65, 73, 76, 79, 82, 85, 86, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 109
 - промотор *с.и.* Промотор P_{RE} и Промотор P_{RM}
 - регуляция негативная 31, 36–37,

39, 41, 69, 73, 108, 110, 111, 113, 114, 117, 128

- позитивная 31, 33, 38, 39, 58, 70, 85, 114, 124 128

Ген *cII* 24, 62, 79, 85, 86, 115

- *cIII* 24, 62, 67, 79, 85, 86, 115
- *cro* 19, 23, 24, 58, 62, 67, 68, 69, 87, 116
 - промотор *см.* Промотор P_R
- регуляция 28-33, 37, 39, 41, 58-60, 69, 73, 108-113, 116

GAL1 дрожжей 145

int 65, 70, 71, 73, 74-75, 82

lac Z 89, 94, 108-109, 111, 116. *См. также* β-Галактозидаза

- *lex A* 19, 145, 146
- *N19*, 62, 64, 67, 68, 69, 71, 75, 77, 80
- *O* 67, 77
- *Q* 19, 62, 69, 71, 79
- *recA* 19, 118
- *xis* 74, 75, 76, 82

Гены гомеозисные 79

- регуляция 6, 9, 11, 18 19, 28 30, 38 40, 42, 61, 62, 83, 89, 129, 143 148
- хвостового отростка 63, 65, 69
- экспрессия 9, 11, 78 79, 82, 143. *См. также* Транскрипция
- и сигналы из окружающей среды 6, 9, 11, 18, 62, 79-82
- *gal* 82-83
- *lac*, оператор 89, 109
 - промотор 94, 108-111, 115, 116
- репрессор 82, 89-90, 109, 110-113, 115, 116, 119, 120

Гетероиммунность 86

Диметилсульфат (ДМС) 103, 122, 123.
См. также ДНК-белковые взаимодействия и Метилирование

ДНК 6, 11, 12, 13, 14, 42, 43, 119, 122, 129

- большой желобок 12, 43, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 103, 104, 119, 120, 122, 143, 144
- гибкость 56, 120, 146, 147, 148
- изменения конформации 124, 144

- метилирование 103, 104, 122, 123.
См. также Диметилсульфат
- повреждения 21, 35, 77, 90
- рекомбинация 35, 76, 129
- репликация 13, 14, 20, 42, 62, 74, 93, 129
- структура 12, 13, 43, 56, 106, 119, 144, 145

ДНКаза *см.* ДНК-белковые взаимодействия, футпринтинг

ДНК-белковые взаимодействия 17, 18, 42, 47 49, 51-56, 58-60, 118, 119, 125-126, 134-141, 142, 143-148

- влияние метилирования на связывание белков 123-124
- защита от этилирования 105
- контакты аминокислот с парами оснований 49, 51 56, 123-124, 143
- связывание с нитроцеллюлозными фильтрами 97 98, 100, 105, 118, 123
- футпринтинг 102-105, 107 108, 122, 128
- - с использованием диметилсульфата (ДМС) 103-104, 107, 122, 123
- ДНКазы 102-103, 107, 125

Escherichia coli 9, 10, 26, 41, 76, 119, 129, 135, 138

Зиготная индукция 88

Изопропилтио-β-галактозид (ИПТГ) 89, 109, 110, 111, 119

Иммунитет 22, 23, 85, 86-87, 88, 114-115

Иммунности область 86, 87

Кемпбелла модель 66

- Клонирование 93, 116
- Кооперативность 31–33, 37–39, 107–108, 111, 112, 113, 129, 138–140, 144, 147–148. *См. также* Белок-белковые взаимодействия
- Лизис и лизогения, выбор пути развития 19, 22, 23, 61–62, 65, 71–73, 81
- Лизогения 20–23, 26, 28, 30, 33–35, 38, 61–62, 64–65, 70, 71–73, 77, 79–80, 85–86, 87–88
- Липкие концы (*cos*) хромосомы фага 63, 64
- Литический путь развития (лизис) 20, 21, 22, 37, 61, 64–65, 69–70, 71–72, 74–75, 79, 80
- Метилирование *см.* Диметилсульфат (ДМС), ДНК, ДНК-белковые взаимодействия
- Мутанты по позитивному контролю *см.* Репрессор фага λ и белок GAL4
- Нитроцеллюлоза *см.* ДНК-белковые взаимодействия, связанные с нитроцеллюлозными фильтрами
- Оператор 17, 22, 23, 24, 42–45, 49, 53, 54, 55, 58, 93, 97–100
- левый (O_L) 24, 43, 44, 45, 69, 71, 105, 108, 117, 129
- Оператор левый (O_L), мутации 86, 105
- правый (O_R) 24, 27, 28, 29, 33, 42–45, 58, 71, 73, 103–105, 107–108, 110–113, 116–118, 124–128
- связывание с регуляторными белками 17, 28, 31–33, 35–36, 97–100, 103–104, 110–114, 117, 134–140
- симметрия 42–45, 49, 104, 105
- Плазмиды 93, 94, 109, 110, 116, 120
- Промотор 15, 16–17, 22–23, 24, 25, 56–57, 58, 59, 60
- P_I 70–71, 73, 74
- P_L 24, 69, 73, 74, 75, 76, 115
- P_R 23, 24, 25, 29–30, 37, 38, 39, 41, 57–60, 108, 109, 110–114, 115–117, 127, 128
- $P_{R'}$ 69, 70
- P_{RE} 70–71, 73
- P_{RM} 23, 24, 25, 28–31, 36, 41, 57–58, 60, 70–71, 73, 94, 108, 110–114, 116–118, 125, 126, 127–128
- Профаг 20, 22, 26, 61, 66
- Рекомбинация область 62, 65, 67. *См. также* ген *int*
- Рентгеноструктурный анализ 106, 117, 119–120, 124
- комплекса репрессора с оператором фага 434 119–120
- Репликации область 62, 65, 67. *См. также* Ген *O*
- Репрессор, “гибридные” спирали 120–121
- фага λ , выделение 90–94
- – димеризация 26, 28, 36, 37, 38, 96, 99, 100
- – – инактивация 22, 34–35, 37, 40, 61, 77, 81, 118
- – – как негативный регулятор 29, 31–33, 58, 86, 110, 111, 113, 128
- Репрессор фага λ как позитивный регулятор 29–30, 31–33, 57, 58, 86, 110, 111, 113, 127–128, 142, 144, 148
- – контакты с РНК-полимеразой 29–30, 31–33, 34, 58, 124–129. *См. также* Белок-белковые взаимодействия
- – – концентрация в клетке 33–34, 38–39, 90, 98, 99, 110, 111, 134–136, 140, 142
- – – равновесие мономеров и димеров 26, 38, 41, 96, 100–101
- – – связывание с ДНК 27, 31–33, 38, 40, 41, 42–45, 48–49, 51–56, 91–92,

97-100, 102-105, 106-114, 119, 122-127, 129
--- "узкая" спираль 47, 49, 51-55, 119, 121, 123, 125, 127
- 434 41, 87, 92, 118, 119, 120, 121
- P22 41, 120, 121, 126-127
Ретрорегуляция 74, 75, 82
РНК матричная (мРНК) 14, 16, 67, 68, 69, 73, 74, 75. *См. также* Транскрипция
РНКазы III 74
РНК-полимераза 17, 22, 25, 34, 56, 69, 75, 114, 117, 124, 129, 142, 144

β -Слой 49-50

α -Спираль 46-47, 49-50, 104, 119-121, 123, 143

SOS-ответ 77-78

Транскрипция 13, 15, 16, 17, 18, 25, 56-67, 127-129, 144, 145

УФ-облучение 35, 77, 90

Участок (сайт) *attB* 66, 75, 76, 77

-- *attP* 66, 75

- *Nut* 68, 69, 77

- *Qut* 70

- *sib* 74, 75

- *UAS_G* 143, 146

Фаг 434 41, 86, 87, 122. *См. также* Репрессор фага 434

- P22 41, 120, 122. *См. также* Репрессор фага P22

- λ , вырезание (эксцизия) 62, 66, 73, 75, 129. *См. также* Белок *Xis*

- генетическая карта 63. *См. также* Фаг λ , хромосома

-- жизненный цикл 19, 20, 61-67, 68. *См. также* Литический путь развития

-- заражение 10, 20, 61, 90, 114, 115

-- интеграция 62, 63, 65, 66-67, 73-76, 129. *См. также* Белок *Int* мутанты *P_{RM} Up-1* 106, 111, 113, 116, 117

-- λ *vir* 85, 92, 105, 114

-- регуляция генов 6, 7, 11, 18, 19, 20-23, 61-62, 63, 66, 71, 73, 77, 78, 83

-- хромосома 20-23, 61, 62-67, 69-76, 86, 87, 88

- λ *imm⁴³⁴* 87, 91, 92, 115

Ферменты рестрикции 93, 144

Эймса тест на канцерогенность 78

Этилендиаминдиметилэтанол-амин 105, 123. *См. также* ДНК-белковые взаимодействия

Эукариотические клетки, гены 6, 9, 80, 81, 143, 145, 148

Эукариотические клетки, ДНК 140, 141

развитие 6, 9, 11, 19, 77-79, 80-83

-- регуляторный белок 81, 141, 143, 148. *См. также* Белок *GAL4*

-- ядро 80-81, 140-141

Оглавление

От редактора перевода	5
Предисловие	6
Введение	9
Глава 1. Основные компоненты регуляторного механизма	20
Компоненты переключателя	23
ДНК	23
РНК-полимераза	25
Репрессор	26
Белок σ	27
Действие репрессора и σ	28
Негативная регуляция	29
Позитивная регуляция	29
Кооперативное связывание репрессора	31
Индукция – переключение регуляторного аппарата	33
Кооперативность: устойчивость и чувствительность переключателя генов	37
Действие авторегуляции	40
Другие фаги	41
Литература: обзоры	41
Глава 2 ДНК-белковые взаимодействия и регуляция активности генов	42
Оператор	42
Репрессор	46
Белок σ	49
Взаимодействие аминокислот с парами оснований	51
Промотор	56
Регуляция генов	58
Литература: обзоры	60
Глава 3 Регуляторные механизмы и жизненный цикл фага	61
Краткое описание развития фага	62

Генетическая карта	62
Циклизация	63
Экспрессия генов	63
Предранние	64
Ранние	64
Поздние	65
Интеграция	66
Регуляция транскрипции	67
Предранняя стадия	67
Ранняя стадия	67
Поздняя стадия литической инфекции	69
Поздняя стадия тизогении	70
Принятие решения	71
Регуляция интеграции и эксцизии	73
Установление тизогении	73
Литический рост	74
Индукция	75
Другие фаги	76
SOS-ответ	77
Пути развития фага λ и развитие эукариотических клеток: возможные аналогии	78
Регуляторные гены	78
Переключатели	80
Способы экспрессии генов	82
Механизмы регуляции	83
Литература: обзоры	83
Глава 4. Откуда мы это знаем? Ключевые эксперименты	84
Гипотеза о существовании репрессора	84
Прозрачные и вирулентные мутанты	84
Наблюдения	84
Объяснение	86
Иммунность и гетероиммунность	86
Наблюдения	86
Объяснение	87
Асимметрия бактериальной конъюгации	87
Наблюдения	87
Объяснение	88
Проблема репрессора в начале 60-х гг.	89
Выделение репрессора и его связывание с ДНК	90
Получение большого количества репрессора	93
Основные положения гл. 1 и 2	94
Репрессор состоит из двух глобулярных доменов, соединенных мостиком примерно из 40 аминокислот	94
Репрессор димеризуется главным образом благодаря взаимодействию С-концевых доменов	96
Димер репрессора связывается своими N-концевыми доменами с операторным участком длиной 17 пар оснований	97

Один операторный участок связывает один димер репрессора	97
Димер образуется до связывания с ДНК	100
С ДНК контактирует N-концевой домен	102
Правый оператор состоит из трех участков связывания репрессора длиной 17 пар оснований каждый Репрессор и белок Cro связываются с одной и той же стороны двойной спирали в каждом участке связывания	104
Химическое зондирование	105
Мутантные операторы	105
Связывание со сверхспиральной и линейной ДНК	106
Репрессор связывается с тремя операторными участками O_R проявляя при этом альтернативную попарную кооперативность Кооперативность обеспечивается взаимодействиями между C-концевыми доменами соседних димеров	107
В лизогенных клетках репрессор обычно связан с O_R1 и O_R2 Связанные молекулы репрессора выключают транскрипцию гена <i>cro</i> осуществляющуюся слева направо, и стимулируют транскрипцию гена <i>cI</i> и <i>tu</i> ную справа налево При более высоких концентрациях репрессор связывается с O_R3 и выключает транскрипцию <i>cI</i>	108
Cro вначале связывается с O_R3 а затем с O_R1 и O_R2 таким образом он вначале выключает P_{RM} а затем P_R	114
Некоторые общие сведения о белке Cro	114
Белок Cro in vivo	116
Белок Cro in vitro	117
Белок RecA расщепляет репрессор и тем самым запускает индукцию	118
Связывание Cro с O_R3 запускает механизм переключения	118
Репрессор и Cro связываются с оператором так как это показано на рис 2.6, 2.8 и 2.10	119
Рентгеноструктурный анализ	119
Получение и свойства «гибридных спиралей»	120
Роль «рук» λ -репрессора	122
Специфические контакты аминокислот с основаниями	123
Репрессор активирует транскрипцию гена <i>cI</i> связываясь с O_R2 и контактируя с полимеразой своим N-концевым доменом	124
Мутации нарушающие позитивную регуляцию	124
Позитивная регуляция in vitro	127
Заключение	128
Литература	130
Обзоры	130
Оригинальные статьи	130
Приложение 1 Конструирование белка, эффективно связывающегося с ДНК	134
Резюме	134
Специфическое и неспецифическое связывание	134
Увеличение специфичности	137
Увеличение концентрации белка	137
Повышение специфичности	137
Использование кооперативности	138
ДНК-белковые взаимодействия у эукариот	140
Литература: оригинальные статьи	141

Приложение 2. Сильные и слабые взаимодействия .	142
Приложение 3. Единый механизм регуляции транскрипции у эукариот и прокариот	143
Литература: оригинальные статьи	148
Предметный указатель	150