



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 14 \* № 1 \* 1988

УДК 577.214.622 : 579.841.51'112

## КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА РИБОСОМНОГО БЕЛКА HS4 АРХЕБАКТЕРИИ *HALOBACTERIUM HALOBIUM*

*Спиридонова В. А., Каграманова В. К., Баратова Л. А.,  
Голова Ю. Б.\*, Чекулаева Л. Н.\*\*, Манькин А. С.*

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского МГУ;*

*\* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;*

*\*\* Институт биофизики Академии наук СССР, Пущино-на-Оке Московской обл.*

Согласно современным представлениям, архебактерии наряду с эубактериями и эукариотами составляют третье эволюционное царство и обладают рядом принципиальных особенностей в хранении и реализации генетической информации [1]. Этим объясняется большой интерес к изучению основных внутриклеточных процессов (транскрипция, трансляция и др.) в этих организмах. Исследование белоксинтезирующего аппарата архебактериальной клетки было до сих пор сконцентрировано в основном на структуре рРНК и их генов [2–7]. Полученные данные [3–5] позволяют предположить, что структура этих генов и их экспрессия имеют ряд особенностей по сравнению с эубактериями и эукариотами. В то же время почти ничего не известно о генах рибосомных белков архебактерий. Даные об их аминокислотных последовательностях отрывочны: для нескольких белков установлены лишь короткие N-концевые последовательности, а полные первичные структуры определены только для двух белков [8–10].

Ранее в нашей лаборатории была определена полная нуклеотидная последовательность единственного оперона рРНК экстремальной галофильной архебактерии *Halobacterium halobium* [6, 11, 12]. В рамках исследования структуры рибосом архебактерий и изучения закономерностей координированного биосинтеза их компонентов нами предпринято клонирование гена рибосомного белка HS4 *H. halobium*, входящего в группу белков, наиболее прочно связанных с рибосомными РНК [13].

Основой для конструирования олигонуклеотидного зонда, использованного для поиска гена этого белка, явилась определенная ранее [10] последовательность 30 N-концевых аминокислот белка HS4 из родственной архебактерии *Halobacterium cutirubrum*. Исходя из этой аминокислотной последовательности наиболее предпочтительным зондом с точки зрения длины и вырожденности представлялась смесь олигонуклеотидов следующего состава (здесь и далее префикс «d» опущен):

ATC	GAC	GAG	TTC	TTC	GC	
T	T	A	T	T		
		A				
	Ile	Asp	Glu	Phe	Phe	
	16	17	18	19	20	Ala

Для уменьшения вырожденности зонда (64 варианта) была использована таблица частот встречаемости кодонов в единственном известном к началу работы гене архебактериального белка — бактериопсина из *H. halobium* [14]. Хотя в бактериопсине изолейцин встречается 15 раз, а фенилаланин — 13, в его гене для этих аминокислот используются соответственно только кодоны ATC и TTC. Учитывая, что ген бактериопсина и гены рибосомных белков относятся к активно экспрессируемым генам клетки, можно было ожидать, что частоты встречаемости кодонов в них

GAC ATT CGA CGG CTG GGA CGC CGG CCG CTA CCC GCA GAA GGT CCT CGA  
 CGA CTT CCT GAA GCG GCT GTC GAA CGT ATC GAA CAA CGC CGA CCA GCA  
 GGG GTT CGA CGC CGT CGA GAT GGT GAT CGA GCA CGT CGC CCC GCA CAA  
 GGT CGG TGA GAG CGA GGG CGG CAA ACC CGG TCC GAT GGG GCG CGC GAC  
 CAC CTG GAA CGC GAC GCT CTG TGA CGT CGA GAT CGT CGT GAC CGA GAC  
CGA GGA GGT GAC CGC CTG ATG CGG GAC GAA CTC GAA TTC ATC GAA CAA  
 Met Ala Asp Glu Leu Glu Phe Ile Glu Gln  
 Ser Asp Glu Leu Glu Phe Ile Glu Glu  
 CGA CTT CAG CGC AGT CAG ATC GAC GAG TTC TTC GCT GAG GAG CTG CGA  
 Gly Leu Gln Arg Ser Gln Ile Asp Glu Phe Phe Ala Glu Glu Leu Ala  
 Gly Leu Gln Arg Ser Gln Ile Asp Glu Phe Phe Ala Glu Glu Leu Ala  
 CGC GCC GCC TAC GGG TCG ATG GAA CTC CGC CGG ACG CGG ATG GGC ATG  
 Arg Ala Gly Tyr Gly Ser Met Glu Leu Ala Pro Thr Pro Met Gly Met  
 Arg Ala Gly Tyr Gly Ser Met Glx Leu Ala Pro Thr Pro Met Gly-  
 CAG ATC GTC CTG AAG GCC GAG AAG CCC GGG ATG GTC ATC GGG AAA GGC  
 Gln Ile Val Leu Lys Ala Glu Lys Pro Gly Met Val Ile Gly Lys Gly  
 GCG AAG AAC ATC CGG AAG ATC ACC ACA CAG CTC GAG GAG CGA TTC GAC  
 Gly Lys Asn Ile Arg Lys Ile Thr Thr Gln Leu Glu Glu Arg Phe Asp  
 CTC GAA GAC CCA CAG ATC GAC GTG CAG GA  
 Leu Glu Asp Pro Gln Ile Asp Val Gln

Нуклеотидная последовательность участка плазмида pHPS4, кодирующая N-конец белка HS4 *Halobacterium halobium*. Предполагаемая последовательность Шайн-Дальгарно подчеркнута. Для сравнения приведена аминокислотная последовательность белка S4 из работы Матесона [10], начинающаяся с серина

будут близки [15]. В связи с этим фосфотриэфирным методом [16] была синтезирована смесь только четырех олигонуклеотидов, различающихся по положениям 6 и 9:

ATC GAC GAG TTC TTC GC  
T A

Картирование гена белка HS4 проводили методом blot-гибридизации рестриктазных гидролизатов суммарной ДНК *H. halobium* (штамм R1). Для этого суммарную ДНК расщепляли различными рестриктазами, смесь фрагментов фракционировали электрофорезом в 0,8% агарозном геле, переносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовали с 5'-<sup>32</sup>P-меченым олигонуклеотидным зондом (все перечисленные здесь и далее процедуры проводили, как описано в работе [17]). В гидролизате рестриктазой *Pst*I были выявлены три фрагмента, гибридизующиеся с зондовыми олигонуклеотидами. Один из этих фрагментов, имеющий размер 2400 п.о., был клонирован в *Pst*I-сайт плазмида pUC19. После трансформации штамма JM103 *E. coli* и селекции полученных рекомбинантных клонов гибридизацией с олигонуклеотидным зондом было отобрано несколько клонов, дающих наиболее интенсивный гибридизационный сигнал. Один из этих клонов, pHPS4, был использован для дальнейшей работы.

Рестрикционный анализ позволил установить, что клонированный участок ДНК *H. halobium* содержит *Eco*RI-сайт на расстоянии 1400 п.о. от одного из концов фрагмента. Методом Максама — Гилберта была определена последовательность длиной более 500 п.о. в районе *Eco*RI-сайта [18]. В этой последовательности содержался участок, строго комплементарный одному из зондовых олигонуклеотидов ATCGACGAGTTCTTCGC.

Компьютерный анализ исследованной цуклеотидной последовательности выявил рамку считывания, в которой закодирована последовательность аминокислот, почти идентичная N-концевой последовательности белка HS4 *H. cutirubrum* [10] (рисунок). Найденные нами исходнадения (Ser вместо Ala в позиции 1 и Glu вместо Gln в позиции 9) могут быть объяснены либо различием в аминокислотных последовательностях соответствующих белков *H. halobium* и *H. cutirubrum*, либо, скорее, ошибками, допущенными при анализе структуры белка. Рамка считывания белка

HS4 начинается с AUG за три нуклеотида до кодона, соответствующего N-концевой аминокислоте белка.

Интересно, что за 7 нуклеотидов до инициаторного кодона AUG имеется 9-членная нуклеотидная последовательность, строго комплементарная 3'-концу 16S рРНК *H. halobium*. Ранее, при анализе первичной структуры этой 16S рРНК, нами было высказано предположение, что при инициации трансляции у архебактерий работает механизм, аналогичный эубактериальному, основанному на комплементарности 3'-конца 16S рРНК и мРНК в районе связывания рибосом (последовательность Шайн-Дальгарно) [19]. Наличие аналогичной комплементарности между мРНК HS4 белка и 16S рРНК *H. halobium* может служить аргументом в пользу предполагаемого сходства механизмов инициации трансляции у архе- и эубактерий.

В настоящее время проводится установление полной нуклеотидной последовательности гена белка HS4 *H. halobium*.

Авторы выражают признательность И. М. Зыряновой за помощь в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Woese C. R. // Sci. Am. 1981. V. 7. № 1. P. 94–106.
2. Neumann H., Gierl A., Tu J., Leibrock J., Staiger D., Zillig W. // Mol. and Gen. Genet. 1983. V. 192. № 1. P. 66–72.
3. Прангишвили Д. А. // Молекулярная биология. 1983. Т. 17. № 2. С. 234–248.
4. Hoffman J. D., Lau R. H., Doolittle W. F. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 4. P. 1321–1333.
5. Hui J., Dennis P. P. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 3. P. 899–906.
6. Каграманова В. К., Манькин А. С., Тетерина Н. Л., Рубцов П. М., Копылов А. М., Баратова Л. А., Богданов А. А. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 516–522.
7. Jorsch M., Böck A. // Mol. and Gen. Genet. 1985. V. 200. № 2. P. 305–312.
8. Kimura M., Langner G. // FEBS Lett. 1984. V. 175. № 2. P. 203–218.
9. Arndt E., Breithaupt G., Kimura M. // FEBS Lett. 1986. V. 194. № 2. P. 227–234.
10. Yaguchi M., Visentin L. P., Zuker M., Matheson A. T., Roy C., Strom A. R. // Zbl. Bact. Hyg. 1. 1982. Abt. Orig. C3. S. 200–208.
11. Mankin A. S., Kagramanova V. K. // Mol. and Gen. Genet. 1986. V. 202. № 1. P. 152–161.
12. Mankin A. S., Teterina N. L., Rubtsov P. M., Baratova L. A., Kagramanova V. K. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 17. P. 6537–6546.
13. Visentin L. P., Chow C., Matheson A. T., Yaguchi M., Rollin F. // Biochem. J. 1972. V. 130. № 1. P. 103–110.
14. Dunn R., McCoy J., Simsek M., Majumdar A., Chang S. H., RajBhandary U. L., Khronara H. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 18. P. 6744–6748.
15. Robinson M., Lilley R., Little S., Emtage J. S., Yarranton G., Stephens P., Milligan A., Eaton M., Humphreys G. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 17. P. 6663–6671.
16. Oligonucleotide synthesis: a practical approach./Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press Limited, 1984.
17. Маниарис Т., Фрич Э., Сэмбрюк Дж. Молекулярное клонирование (пер. с англ.). М.: Мир, 1984.
18. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
19. Kagramanova V. K., Mankin A. S., Baratova L. A., Bogdanov A. A. // FEBS Lett. 1982. V. 144. № 2. P. 177–180.

Поступило в редакцию  
22.V.1987

#### CLONING OF THE RIBOSOMAL PROTEIN HS4 GENE OF AN ARCHAEBACTERIUM *HALOBACTERIUM HALOBIUM*

SPIRIDONOVA U. A., KAGRAMANOVA U. K., BARATOVA L. A., GOLOVA Yu. B.\*,  
CHEKULAEVA L. N.\*\*, MANKIN A. S.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology  
and Bioorganic Chemistry, Moscow State University;*

\* *Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*  
\*\* *Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Puschino*

Using a synthetic oligonucleotide probe, a gene of the ribosomal protein HS4 from an archaebacterium *Halobacterium halobium* has been cloned and partly sequenced. The translation initiation region contains a sequence complementary to the 3' end of the 16S rRNA.