



УДК 577.21

© 1990 г.

*Е. Б. Патонь, М. И. Вудмаска, С. Б. Золотухин,
А. Н. Живолюб, И. В. Крупская*

**ВЫСОКАЯ КОНСЕРВАТИВНОСТЬ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
БЕЛКА L10 *SALMONELLA TYPHIMURIUM* ПО СРАВНЕНИЮ
С *ESCHERICHIA COLI* ОБЕСПЕЧИВАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ
РЕГУЛЯЦИИ ИМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *rplJL* ОПЕРОНА *E. COLI***

Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев

Кластер генов *rplKAJL* у эубактерий высококонсервативен по структурно-функциональной организации [1]. Показана возможность регуляции экспрессии генов *rplKA* оперона *E. coli* рибосомными регуляторными белками L1 из *Serratia marcescens* и *Proteus vulgaris* [2]. В связи с изучением структурно-функциональной топологии регуляторного белка L10 *E. coli* нас интересовали сравнение его первичной структуры с гомологичным белком из *Salmonella typhimurium* и возможность осуществления белком L10 *S. typhimurium* функции трансляционного репрессора генов *rplJL* оперона *E. coli*. При клонировании *BglII*-фрагмента, содержащего гены *rplA'JL-rpoBC'* *S. typhimurium*, в плазмиду p104, производную pBR322, рекомбинантная плаزمида pNL1 имела низкую стабильность. Кроме того, во всех клонах, содержащих pNL1, обнаруживалась вторая, сопутствующая ей плазмиды [3].

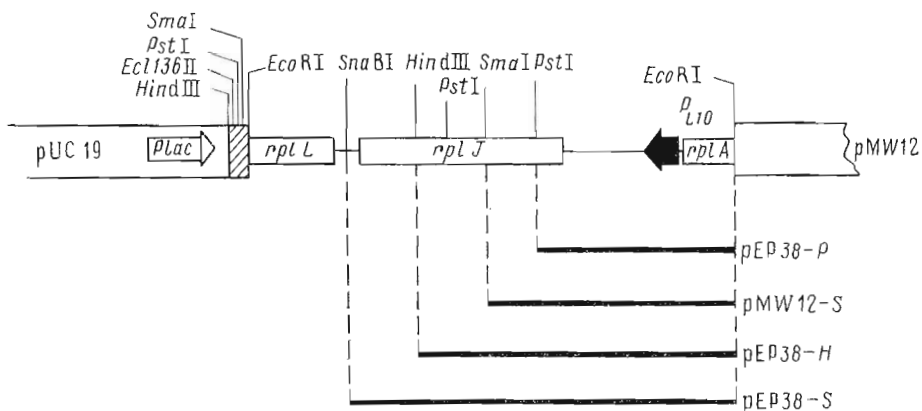
При встраивании нами аналогичного фрагмента ДНК *E. coli* в векторную плазмиду pUC, обладающую более высокой копийностью по сравнению с pBR322 [4], полученные рекомбинантные плазмиды при селекции по фенотипу Rif^r, обеспечиваемому мутацией в гене *rpoB*, были стабильны [5]. Однако все полученные плазмиды содержали встроенный *BglII*-фрагмент в одинаковой ориентации, при которой направление транскрипции с P_{L10} (встроенных генов) было противоположно направлению транскрипции, инициируемой P_{lac} вектора. Известно, что одной из причин нестабильности рекомбинантных ДНК может быть токсичность продуктов экспрессии клонированных генов. В отношении генов *rplJL-rpoB* известно, что суперэкспрессия гена *rpoB* в клетках *E. coli* возможна [6] и не имеет негативного эффекта. Следовательно, можно было полагать, что отсутствие альтернативной ориентации в pUC явилось результатом летального уровня экспрессии генов *rplJL*, обеспечиваемой совокупностью транскрипцией их с P_{lac} (индуцированного для селекции по Lac⁻ фенотипу) и P_{L10} . Известно, что белок L10, являясь регулятором экспрессии генов *rplJL* на уровне трансляции, летален в случае повышенной экспрессии с многокопийной плазмиды, поскольку блокирует синтез второго белка — L7/L12, кодируемого однокопийным хромосомным геном *rplL* [7]. Мы предполагали также, что встречно направленный P_{lac} мог стабилизировать рекомбинантную плазмиду, инициируя антисенс-РНК, снижающую уровень экспрессии встроенных генов. Для *E. coli* охарактеризованы мутации в последовательности-мишени на мРНК, которые нарушают связывание с ней L10 и делают возможным повышенный уровень экспрессии L10 в таких клетках-хозяевах [8].

Учитывая высокую степень консервативности кластера генов *rplKAJL-rpoBC* у энтеробактерий, можно было предполагать, что нестабильность pNL1, содержащей гены *rplJL* *S. typhimurium*, обусловлена токсично-

стью высокого уровня синтеза регуляторного белка L10, который, следовательно, функционировал в качестве регуляторного и в клетках-хозяевах *E. coli*.

В этом случае стабильность рNL1 могла быть повышена при введении ее в клетки *E. coli* с мутацией, нарушающей связывание белка L10 с последовательностью-мишенью на мРНК. При трансформации мутантного штамма *E. coli* JF3029 [8] рNL1 стабильно поддерживалась в нем и могла быть наработана в препаративных количествах. Для последующего клонирования и определения первичной структуры гена *rplJ* *S. typhimurium* исходя из физико-генетической карты рNL1 [3] расщеплением *EcoRI* из нее был извлечен фрагмент *EcoRI-E*, содержащий ген *rplJ* с промотором P_{L10} . Встраивание данного фрагмента в рUC19, предварительно расщепленную *EcoRI* и обработанную щелочной фосфатазой, а также отбор рекомбинантных плазмид и их анализ проводился по стандартным методам [9]. При трансформации продуктами лигазной сшивки клеток *E. coli* JM101 [10], как и в случае P_{L10} -*rplJ*-содержащего фрагмента *E. coli*, наблюдалась единственная противоположная промотору P_{lac} ориентация фрагмента в рекомбинантных плаزمидях. Как и рекомбинантная плазида рEP20, содержащая P_{L10} и *rplJ*-ген *E. coli* [10], аналогичная плазида с P_{L10} -*rplJ*-фрагментом *S. typhimurium* (рMW12) оказывала негативное влияние на жизнеспособность клеток-хозяев *E. coli*. В мутантном хозяине *E. coli* JF3029 плазида была стабильной и могла быть наработана в препаративном количестве. Используя в качестве реципиентного штамма *E. coli* JF3029, мы попытались получить путем трансформации продуктами лигазной сшивки рUC19 и *EcoRI-E* фрагмента *S. typhimurium* рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагмент P_{L10} -*rplJ* *S. typhimurium* в альтернативной ориентации. С помощью этого хозяина получение такой плазмиды (рMW12-1), как и в случае аналогичной плазмиды с геном *rplJ* *E. coli* (рEP20-1), оказалось возможным. Однако плазида рMW12-1, как и рEP20-1, характеризовалась снижением копийности и быстро элиминировалась из клеток. Таким образом, незначительное повышение уровня экспрессии *rplJ* *S. typhimurium* за счет дополнительного участия в транскрипции гена *rplJ* промотора P_{lac} при спонтанном, неиндуцированном уровне транскрипции оказалось критическим. Аналогичный негативный для жизнеспособности клеток-хозяев эффект незначительного увеличения экспрессии отмечен и для регуляторного рибосомного белка S4 *E. coli* (Д. Драйпер, персональное сообщение). Причины этого неясны, и в случае L10, возможно, обусловлены характером мутации JF3029, которая не полностью нарушает связывание регуляторного белка L10 с мутантной последовательностью-мишенью на мРНК L10-L7/L12.

Негативный эффект высокого уровня экспрессии гена *rplJ* *S. typhimurium* свидетельствует о способности этого гетерологичного белка регулировать экспрессию генов *rplJL* оперона *E. coli*. Функциональная активность белка L10 *S. typhimurium* в *E. coli* явилась указанием на высокую консервативность его первичной структуры и определяемой ею вторичной структуры, необходимой для взаимодействия с лидерной последовательностью-мишенью мРНК L10-L7/L12. Проведенный нами далее рестриктный анализ рMW12, содержащий фрагмент P_{L10} — *rplJL* *S. typhimurium*, и сравнение с рEP20, содержащей аналогичный фрагмент *E. coli*, подтвердили сохранность и совпадение локализации сайтов *DraI*, *SmaI*, *HindIII*, *SnaBI* в обоих генах и появление в структурной части гена *rplJ* *S. typhimurium* дополнительного сайта узнавания *PstI*. Полученные данные мы использовали для последующего конструирования субклонов рMW12 и секвенирования их ДНК с использованием *TaqI*-ДНК-полимеразы и обратных праймеров производства НПО «Фермент» (Вильнюс) по методу [11]. Получение субклонов рMW12 для секвенирования проводили следующим образом (рисунок): рMW12-S получили путем делетирования меньшего *SmaI*-фрагмента рMW12, рEP38-H — *HindIII*-фрагмента, рEP38-S — *SnaBI* (в межгенной области *rplJ*)-*Ecl136II*-фрагмента (в полилинкере рMW12), рEP38-P — *PstI*, рEP38-H



Физико-генетическая карта фрагмента плазмиды pMW12, содержащего *rplJ* ген *S. typhimurium*, и схема конструирования субклонов для секвенирования. Полилинкерная область векторной плазмиды pUC19 заштрихована

и pEP38-S. Сравнение нуклеотидной последовательности структурной области гена *rplJ* *S. typhimurium* выявило замены по сравнению с гомологичным геном *E. coli* в кодонах CGC₄₅ → CGT, CGT₆₁ → CGC, GCC₁₀₉ → GCT, GCT₁₁₀ → GCA, CGT₁₅₂ → CGC, ACT₁₅₃ → ACA, GCG₁₆₀ → GCA, не приводящие к замене аминокислот. Отличия в гене *rplJ* *S. typhimurium* по сравнению с *E. coli* [12], приводящие к аминокислотным заменам, наблюдались лишь по кодонам GCT₆₂ → GTC, CCG₆₇ → CAG, GCG₇₄ → ACG. При заменах аминокислот Ala₆₂ → Val, Pro₆₇ → Gln, Ala₇₄ → Thr, следовательно, сохраняется способность L10 белка *S. typhimurium* взаимодействовать с последовательностью-мишенью на мРНК *E. coli* и ингибировать экспрессию генов *rplJL* оперона *E. coli*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tittawella I. P. B. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 195. № 2. P. 215—218.
2. Sor F., Nomura M. // Mol. Gen. Genet. 1987. V. 210. № 1. P. 52—59.
3. Свердлов Е. Д., Лисицын Н. А., Гурьев С. О., Смирнов Ю. В., Ростаншов В. М., Монастырская Г. С. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 699—707.
4. Taylor D. E., Brose E. C. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 18. P. 9056.
5. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. // Биополимеры и клетка. 1986. Т. 2. № 4. С. 217—219.
6. McKinney J. D., Lee J., O'Neill R. E. O., Goldfarb A. // Gene. 1987. V. 58. № 1. P. 13—18.
7. Fill N. P., Bendiak D., Collins J., Friesen J. D. // Mol. Gen. Genet. 1979. V. 173. № 1. P. 39—50.
8. Fill N. P., Friesen J. D., Downing W. L., Dennis P. P. // Cell. 1980. V. 19. № 2. P. 837—844.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
10. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. // Биополимеры и клетка. 1988. Т. 3. № 4. С. 163—167.
11. Innis M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H., Brow M. A. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 9436—9440.
12. Post L. E., Strycharz G. D., Nomura M., Lewis H., Dennis P. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 1697—1701.

Поступило в редакцию
25.XII.1989

Е. В. ПАТОН, М. И. ВУДМАСКА, С. В. ЗОЛОТУХИН,
А. Н. ЗИВУЛОУП, И. В. КРУПСКАЯ

ABILITY OF THE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* r-PROTEIN L10 TO REGULATE EXPRESSION OF GENES IN THE *E. COLI* *rplJL* OPERON IS PROVIDED BY THE PROTEIN'S HIGHLY CONSERVED PRIMARY STRUCTURE

Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

The multicopy pMW12 recombinant plasmid containing P_{L10} controlled *rplJ* gene of *Salmonella typhimurium*, had a growth inhibiting effect on *E. coli* host cells. Sequence determination of the *S. typhimurium rplJ* gene showed its striking homology to the analogous *E. coli* gene.