



УДК 577.346

**МУТАЦИЯ *ssyF29* В ГЕНЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1 *E. coli*,
СУПРЕССИРУЮЩАЯ ДЕФЕКТ ТРАНСПОРТА БЕЛКОВ ЧЕРЕЗ
МЕМБРАНУ, ОБУСЛОВЛЕНА ВСТРАИВАНИЕМ IS10R-ЭЛЕМЕНТА**© 1996 г. В. С. Артамонова, И. В. Бони[#]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 18.07.96 г.

Установлено положение и природа *ssyF29*-мутации в гене *rpsA*, приводящей к синтезу укороченной формы рибосомного белка S1. Показано, что *ssyF*-мутация обусловлена встраиванием инсерционного элемента IS10(R), что приводит к терминации трансляции соответствующей мРНК на первых нуклеотидах вставки и продукции укороченного с С-конца белка, содержащего 464 аминокислотных остатка вместо 557 в белке дикого типа. Мутантный (*ssyF*) ген *rpsA* не кодирует дополнительных аминокислот по сравнению с геном *rpsA* дикого типа.

Ключевые слова: ген *rpsA*, *ssyF*-мутация, встраивание IS10R-элемента.

Рибосомный белок S1 – ключевой мРНК-связывающий белок трансляционного аппарата *Escherichia coli* и других грамотрицательных бактерий [1–3]. Его функции в клетке не ограничиваются только участием в связывании мРНК с рибосомой: он входит в состав репликаз РНК-содержащих бактериофагов [4], промотирует расщепление (по домену Шайна–Дальгарно) некоторых ранних мРНК фага T4 высокоспецифической эндонуклеазой – продуктом раннего фагового гена *regB* [5], предположительно может ингибировать процесс антитерминации транскрипции [6], является трансляционным ауторепрессором [7].

Способность белка S1 участвовать в столь различных клеточных процессах, происходящих на уровне РНК, определяется его сложным молекулярным дизайном. Белок S1 содержит 557 аминокислотных остатков, которые образуют два функциональных домена: N-концевой домен (171 а.о.) имеет глобулярную структуру и отвечает за белок-белковые взаимодействия, включая связывание с рибосомой. Сильно вытянутый стержнеобразный С-концевой домен является РНК-связывающим доменом и включает 4 высокоомологичных повтора R1–R4 (71–74 а.о. в каждом), что уникально для рибосомных белков [1]. Функции этих повторов в РНК-связывающей активности белка S1 *in vivo* пока остаются загадкой, так как в связи с жизненной важностью и полифункциональностью этого клеточного компонента мутационный анализ крайне затруднителен.

К настоящему времени известны только три хромосомных мутанта *E. coli* по гену *rpsA* (S1): 1) условно-летальный амбер-мутант с термочувствительным супрессором [8]; 2) мутант, продуцирующий укороченную (на 120 а.о. с С-конца) форму белка S1, названную m1-S1, причем характеристика мутации отсутствует и секвенирован только мутантный белок [9, 10]; 3) *ssyF*-мутант, выделенный как экстрагенный супрессор известной мутации *secY24(Ts)*, вызывающей дефект в процессинге и транспорте мембранных белков при непермиссивных температурах [11]. Показано, что SsyF-форма белка S1 короче, чем белок дикого типа, но все же длиннее, чем форма m1-S1, и, кроме того, супрессорная активность белка m1-S1 крайне мала, хотя фенотипически оба мутанта близки [11]. Последние два типа мутантов представляют большой интерес для исследования функций S1 *in vivo*, так как сравнение их по активности с диким типом может выявить роль гомологичных повторов (по крайней мере С-концевого R4) в разных клеточных процессах и пролить свет на механизм супрессии дефекта белкового транспорта.

В ходе исследования механизма ауторепрессии синтеза белка S1 *in vivo* мы получили данные, указывающие на дефект аутогенного контроля гена *rpsA* в *ssyF29*-мутанте, что заставило нас обратиться к структурным исследованиям мутантного гена с целью локализации мутации (по предположению авторов, делеционной [11]) и определения точной длины и последовательности мутантного белка. Фрагменты ДНК, соответствующие гену *rpsA* дикого типа и мутантному *ssyF*-гену, были получены с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии праймеров,

Сокращения: а.о. – аминокислотный остаток.

[#] Автор для переписки: тел./факс: (7-095) 330-65-38, e-mail: irina@genome.siohc.ras.ru.

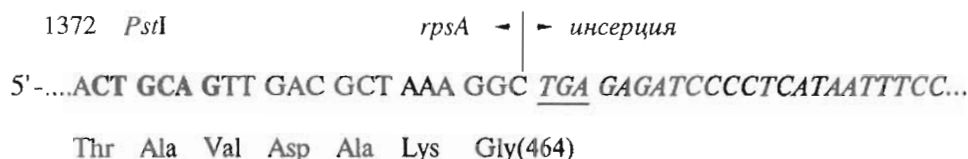


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность участка гена *rpsA*, содержащего инсерционную мутацию *ssyF* (нуклеотидные остатки в инсерции выделены курсивом, *Pst*I-сайт выделен жирным шрифтом, стоп-кодон подчеркнут) и соответствующая аминокислотная последовательность на С-конце мутантного белка S1,

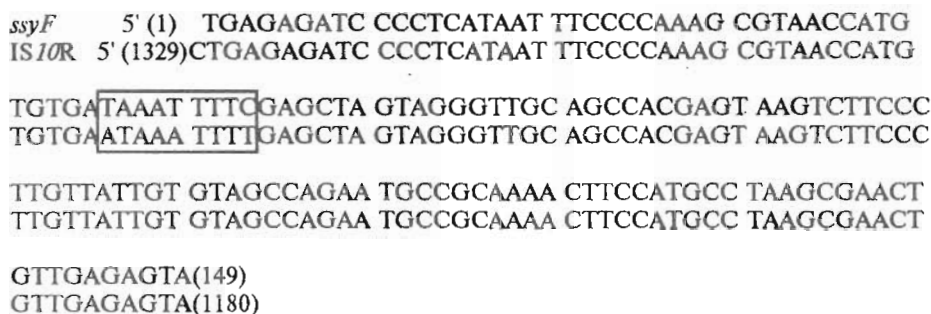


Рис. 2. Гомология 5'-концевой последовательности инсерции в *ssyF*-мутанте гена *rpsA* (верхние строки) и последовательности транспозиционного элемента *IS10R* [14] (нижние строки). Участок неполного соответствия обведен рамкой.

соответствующих последовательностям в 5'- и 3'-фланкирующих ген *rpsA* областях:

S1-dir
 5'(-66)GTATGTTAAACAACCCATCCG(-45) [12],
S1-rev
 5'(1738)ACGAAACCTGCAATCTGTCAAG(1717) [13].
 (Здесь и далее цифры в скобках указывают положение нуклеотидных остатков относительно первой буквы инициаторного кодона гена *rpsA*.) Матрицей служила хромосомная ДНК, выделенная из штаммов *E. coli* K-12, несущих дикий или мутантный (*ssyF29*) аллели *rpsA*. Источником *ssyF29*-мутации был штамм IQ646, описанный в работе [11].

Анализ продуктов ПЦР в агарозном геле показал, что мутантный ген длиннее дикого на 1.2–1.3 тыс. п.о. и, таким образом, мутация имеет делеционную, а инсерционную природу. Для локализации мутации был проведен рестрикционный анализ (рестриктная карта гена *rpsA* известна [13]), в результате которого стало ясно, что вставка расположена между рестриктными сайтами *Pst*I (1378) и *Hind*III (1643). Для определения природы вставки соответствующий *Pst*I–*Hind*III-фрагмент был клонирован в векторе pUC19/*Pst*I–*Hind*III и полученные рекомбинатные плазмиды были секвенированы по методу Сэнгера с использованием Sequenase Version 2.0, набора реагентов и протокола фирмы USB (United States Biochemical Corporation). Анализ последовательности ДНК, полученной в первом раунде секвенирования, позволил локализовать инсерцию, определить длину и С-концевую последовательность мутантного белка S1 и идентифицировать вставку как инсерционный элемент *IS10R* (рис. 1, 2).

Мобильные элементы *IS10* (правый R и левый L) являются структурно-интактными флангами транспозона *Tn10* и представляют собой обращенные повторы [14]. Несмотря на большое структурное сходство, *IS10*-элементы неидентичны: в норме за транспозиционную функцию отвечает *IS10R*, кодирующий белок транспозазу, которая промотирует транспозицию как целого транспозона *Tn10*, так и самого элемента *IS10R*, в то время как *IS10L* является функционально дефектным и при инактивации элемента *IS10R* проявляет лишь 1–10% активности последнего [14]. Транспозиция *IS10*-элементов как в хромосомные, так и в плазмидные гены может быть причиной спонтанных мутаций, и в нашем случае мы имеем дело с одной из них.

Встраивание элемента *IS10R* в ген *rpsA* в *ssyF*-мутанте произошло таким образом, что привело к укорачиванию с С-конца белковой последовательности дикого типа без привнесения дополнительных аминокислот, отсутствующих в белке S1, так как последовательность *IS10R* имеет в самом своем начале стоп-кодон (см. рис. 1, 2). В результате мутант продуцирует укороченную форму белка S1, содержащую 464 а.о. вместо 557 в белке дикого типа. Таким образом, согласно карте расположения гомологичных повторов в РНК-связывающем домене белка S1, в мутантной форме *SsyF29* (m29-S1[11]) почти полностью отсутствует повтор R4 (рис. 3).

Существование природных мутантов белка S1, укороченных с С-конца, говорит о том, что повтор R4 не является жизненно необходимым для клетки, хотя его отсутствие и приводит к нарушению

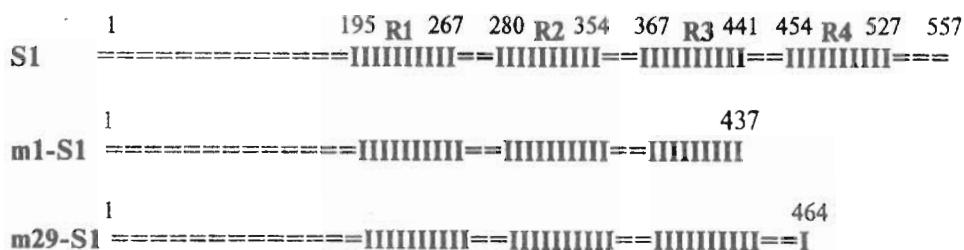


Рис. 3. Доменная структура белка S1 и его мутантных форм m1-S1 и m29-S1 (*SsyF29*). Цифры на схеме указывают положение аминокислотных остатков. R1–R4 – гомологичные повторы в РНК-связывающем домене белка S1 [1].

нормального клеточного роста и холодоустойчивости [11]. Какие специфические функции белка S1 *in vivo* при этом затрагиваются и каков механизм супрессии дефекта в процессинге и транспорте мембранных белков, обусловленного мутацией в интегральном мембранном компоненте SecY, еще только предстоит узнать. По предварительным данным (Бони И.В., Дрейфус М.), мутант *ssyF29* дефектен, по крайней мере по аутогенному контролю трансляции *rpsA* мРНК.

Авторы выражают благодарность М. Шпрингеру (M. Springer) (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, France) и М. Дрейфусу (M. Dreyfus) (CNRS URA 1302, Ecole Normale Supérieure, Paris, France) за предоставление штаммов *E. coli* и интерес к данной работе.

Работе поддержана грантом в рамках государственной научно-технической программы России "Новейшие методы биоинженерии: геновая и клеточная инженерия" за 1996 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Subramanian A.R. // Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 1983. V. 28. P. 101–142.
2. Roberts M.W., Rabinowitz J.C. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 2228–2235.
3. Boni I.V., Isaeva D.M., Musychenko M.L., Tzareva N.V. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 155–162.
4. Wahba A.J., Miller M.J., Niveleau A., Landers T.A., Carmichael G.G., Weber K., Hawley D.A., Slobin L.J. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 3314–3316.
5. Ruckman J., Ringquist S., Brody E., Gold L. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 26655–26662.
6. Patterson T.A., Zhang Z., Baker T., Johnson L.L., Friedman D.I., Court D.L. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. P. 217–228.
7. Scouv J., Schnier J., Rasmussen M.D., Subramanian A.R., Pedersen S. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 17044–17049.
8. Kitakawa M., Isono K. // Mol. Gen. Genet. 1982. V. 185. P. 445–447.
9. Ono M., Kuwano M., Mizushima S. // Mol. Gen. Genet. 1979. V. 174. P. 11–15.
10. Subramanian A.R., Mizushima S. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 4308–4312.
11. Shiba K., Ito K., Yura T. // J. Bacteriol. 1986. V. 166. P. 849–856.
12. Pedersen S., Skouv J., Kajitani M., Ishihama A. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 196. P. 135–140.
13. Schnier J., Isono K. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. P. 1857–1865.
14. Halling S.M., Simons R.W., Way J.C., Walsh R.B., Kleckner N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 2608–2612.

The *ssyF29* Mutation in the *Escherichia coli* S1 Ribosomal Protein Gene Suppressing a Defect in Transmembrane Protein Transport Results From Insertion of the IS10R Element

V. S. Artamonova and I. V. Boni

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

Abstract—The nature of the *ssyF29* mutation causing the synthesis of a truncated form of the ribosomal protein S1 and its location in the *rpsA* gene were determined. The *ssyF* mutation was found to result from insertion of the IS10(R) element which causes the termination of translation of the corresponding mRNA at the first insertion nucleotide and the production of the S1 protein which is truncated at the C-terminus and composed of 464 amino acid residues (instead of 557 residues in the wild-type protein). The mutant *rpsA* gene (*ssyF*) encodes no additional amino acid residues as compared with the wild-type *rpsA* gene.

Key words: *rpsA* gene, *ssyF* mutation, insertion of the IS10R element.