



УДК 577.214(6+625):577.218

ИНТЕГРАЦИЯ ЭЛЕМЕНТА IS186 В –10-ОБЛАСТЬ ПРОМОТОРА ТЕПЛООВОГО ШОКА *lon*-ГЕНА *Escherichia coli*

© 1997 г. К. Б. Игнатов[#], Л. Г. ЧистяковаИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 16.05.96 г.

Обнаружено встраивание элемента IS186 в –10-область промотора *lon*-гена *Escherichia coli*, приводящее к подавлению экспрессии данного гена. Найдена гомология между местами интеграции элемента IS186, –10-областью промоторов теплового шока *E. coli* и нуклеотидной последовательностью на конце инвертированного повтора IS186.

Ключевые слова: IS-элемент, участки интеграции, ген *lon*, промоторы теплового шока.

Ген *lon* кодирует La-протеиназу, осуществляющую АТФ-зависимый протеолиз аномальных и гетерологичных белков в клетках *Escherichia coli*. Ген находится под контролем промотора теплового шока, и его экспрессия может быть индуцирована повышением температуры до 42°C.

Ранее *lon*-ген был клонирован в плазмиде рBR327 по сайтам рестрикции *EcoRI* – *SphI*. Полученная плазида рBRlon содержит *lon*-ген под контролем его собственных регуляторных элементов [1].

При работе с плазмидой рBRlon в клетках *E. coli* AB1899 было обнаружено несколько клонов, содержащих плазмиду со вставкой большей молекулярной массы, чем у исходной плазмиды. Секвенирование полученных плазмид, проведенное по методу Сенгера, показало, что в область –10 промотора *lon*-гена встроился IS-элемент, который оказался идентичен элементу IS186, описанному в работах [2, 3] (рис. 1). Плазида, содержащая IS-элемент, была названа рBLI.

Подвижный генетический элемент IS186 впервые был обнаружен интегрированным в GC-богатый участок, находящийся на стыке кДНК и векторной плазмиды рBR322 [2, 3]. В работе [2] было отмечено наличие гомологии между элементами IS186 и IS4. В дальнейшем были описаны случаи интеграции IS186 в плазмиду рAW40, сопровождавшиеся дубликацией участков ДНК различной длины [4], что характерно для элементов IS1, Th5 и IS4 [5].

Места локализации IS186 в хромосоме *E. coli* K12 приведены в работах [6–8].

Во всех указанных выше случаях интеграции элемента IS186 функционально важные участки генов не затрагивались. Интеграция IS186 в кодирующую область гена *ascG* и ее последствия рассмотрены в работе [9]. Однако встраивание IS186 в область промотора к настоящему моменту в литературе описано не было.

Анализируя известные участки интеграции IS186, мы обнаружили, что они гомологичны 5–6 нуклеотидам на конце инвертированного повтора элемента IS186 (рис. 2а). Этот факт говорит о способности данного IS-элемента встраиваться в непосредственной близости от участка ДНК, гомологичного его концевой последовательности. В нашем случае мишенью для встраивания элемента IS186 послужила –10-область промотора теплового шока гена *lon*. На рис. 2б представлено сравнение нуклеотидных последовательностей –10-области промоторов теплового шока некоторых генов *E. coli* [10] и концевой участка IS186. Повидимому, в силу имеющейся гомологии –10-область промоторов теплового шока *E. coli* может быть потенциальной мишенью для встраивания IS186.

Хорошо известно, что интеграция IS-элементов в промоторные области оказывает различное влияние на экспрессию генов: от увеличения экспрессии в несколько раз до полного ее подавления [11]. Чтобы выяснить, как повлияла интеграция IS-элемента на экспрессию *lon*-гена, клетки *E. coli* AB1899 с мутацией *lon100* были трансформированы плазмидами рBR327, рBRlon и рBLI. Уровень экспрессии *lon*-гена в клетках *E. coli*, несущих различные плазмиды, оценивали по стандартной методике, определяя скорость деградации ³H-меченых пуromициновых полипептидов [12].

[#] Автор для переписки.

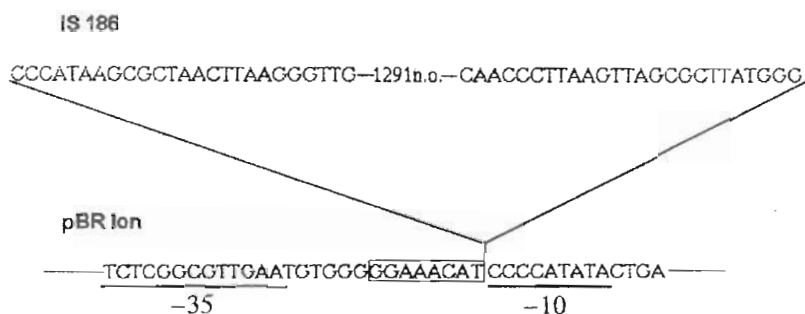


Рис. 1. Интеграция элемента IS186 в -10-область промотора теплового шока *lon*-гена *E. coli*. В рамку выделен участок ДНК, дублирующийся при встраивании IS-элемента. Подчеркнуты -10- и -35-области промотора.

(a)		(б)	
		-10	
pRV216--	↓ccCCCcTg--	<i>groE</i>	--C CCCAT TT--
pRV245--	c↓cCCCcTg--	<i>dnaK</i>	--C CCCAT TT--
pRV310---	gC↓CCcTa--	C 62.5	--C CCCAT CT--
pBRlon---	↓cCCCcTa---	<i>lon</i>	--C CCCAT AT--
pAW40----	cCCCcTcc↓--	consensus	--C CCCAT t Ta
IS 186	CCCcTa--	IS 186	CCCAT AA--

Рис. 2. Сравнение нуклеотидной последовательности фланкирующего участка элемента IS186 с местами интегрирования (а) и последовательностью -10-области промоторов теплового шока *E. coli* (б). Место встраивания IS-элемента отмечено вертикальной стрелкой. Встраивание IS186 в плазмиды pRV и в плазмиду pAW40 описано в работах [2, 4] соответственно. Нуклеотидные последовательности промоторов теплового шока *E. coli* приведены в работе [10].

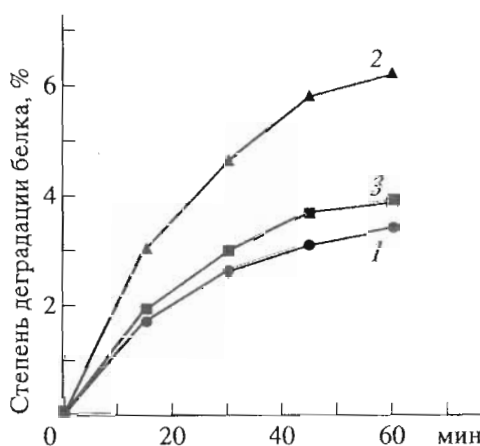


Рис. 3. Скорость деградации [³H]пурамициновых полипептидов в клетках *E. coli* AB1899, содержащих плазмиды pBR327 (1), pBRlon (2) и pBL1 (3).

Результаты (рис. 3) свидетельствуют, что интеграция IS186 в промоторную область *lon*-гена значительно подавляет его экспрессию.

Можно предположить, что в случае сайт-специфической интеграции в -10-область промоторов теплового шока *E. coli* элемент IS186 подавляет экспрессию генов, контролируемых этими промоторами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались штамм *E. coli* AB1899 (*F⁻, thr1, leuB, proA2, his4, thi1, argE3, lacY1, galK2, ara14, xyl5, mil1, tsx33, str31, supE44, ton100*); плазмиды pBR327, pBRlon (получена ранее и описана в работе [1]), pBL1 (получена в процессе работы).

Плазмидную ДНК из клеток *E. coli* выделяли по модифицированному методу Бирнбойма и Дולי [13]. Трансформацию клеток *E. coli* проводили по методу Хакаhana [14].

Секвенирование по Сенгеру осуществляли с использованием Sequenase ver. 2 Т7-ДНК-полиме-

разы фирмы United States Biochemical (USB) по протоколу USB.

Степень деградации пурамициновых полипептидов измеряли согласно методу Гольдберга [12].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Америк А.Ю., Чистякова Л.Г., Остроумова Н.И., Гуревич А.И., Антонов В.К. // Биорган. химия. 1988. Т. 14. С. 408-414.
2. Chong P., Hui I., Loo T., Gillam S. // FEBS Lett. 1985. V. 192. P. 47-52.
3. Kothary R.K., Jones D., Candido E.P.M. // J. Bacteriol. 1985. V. 164. P. 957-959.
4. Sengstag C., Lida S., Hienstand-Naewer R., Arber W. // Gene. 1986. V. 49. P. 153-156.
5. Chu C.C., Clark A.J. // Plasmid. 1989. V. 22. P. 260-264.
6. Birkenbihl R.P., Vielmetter W. // Mol. Gen. Genet. 1991. V. 226. P. 318-320.

7. Coderre P.E., Earhart C.F. // J. Gen. Microbil. 1989. V. 135. P. 3043–3055.
8. Yura T., Mori H., Nagai H., Nagata T., Ishihama A., Fujita N., Isono K., Mizobuchi K., Nakata A. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 3305–3308.
9. Hall B.G., Xu L. // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9. P. 688–706.
10. Lindquist S. // Ann. Rev. Biochem. 1986. № 55. P. 1151–1191.
11. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. С. 76–80.
12. Goldberg A.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. P. 422–426.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 101–102.
14. Ханахан Д. // Клонирование ДНК. Методы / Ред. Д. Гловер. М.: Мир, 1988. С. 154–155.

Integration of the Insertion Element IS186 into the –10 Region of the Heat Shock Promoter of the *Escherichia coli lon* Gene

K. B. Ignatov and L. G. Chistyakova

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

Abstract—The insertion element IS186 was found to be incorporated into the –10 region of the promoter of the *E. coli lon* gene. The integration represses *lon* gene expression. Homology between the integration sites of IS186, the –10 region of *E. coli* heat shock promoters, and the terminal inverted repeat of IS186 was revealed.

Key words: insertion element, integration sites, *lon* gene, heat shock promoters.