



УДК 577.217

## РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ ДИСТАЛЬНОГО ГЕНА *lacZ* ПОЛИЦИСТРОННОЙ мРНК ПОТОКОМ РИБОСОМ С ПРОКСИМАЛЬНОГО ГЕНА

© 1997 г. Г. Н. Николенко<sup>#</sup>, В. В. Кравченко, Е. С. Сваровская, И. П. Гилева, В. А. Лихошвай, В. Г. Коробко\*

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"  
Минздравмедпрома РФ, 633159, Новосибирская обл., пос. Кольцово;

\* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 23.05.96 г.

Сконструированы четыре серии плазмид pNSI, pNSII, pNLI, pNLII, содержащих искусственные полицистроны с тест-геном *lacZ*. Эти плазмиды обеспечивают синтез полицистронных мРНК двух типов сопряжения цистронов *orfZ* и *lacZ*: I тип – терминирующий кодон *orfZ* и иницирующий кодон *lacZ* перекрываются (pNSI, pNLI); II тип – терминирующий кодон цистрона *orfZ* расположен перед SD-сайтом *lacZ* (pNSII, pNLII). Размер цистрона *orfZ* различен и соответствует 60 п. о. в сериях плазмид pNSI, pNSII и 300 п. о. в сериях плазмид pNLI, pNLII. Структура района инициации трансляции гена *lacZ* во всех вариантах полицистронных мРНК одного типа сопряжения цистронов оставалась неизменной. Вариации затрагивали структуру района инициации трансляции цистрона *orfZ*, обеспечивая различную эффективность трансляции гена *orfZ* (поток рибосом) в вариантах плазмид каждой серии. Влияние этих изменений на эффективность трансляции гена *lacZ* определяли прямым измерением активности β-галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих соответствующие плазмиды. Выявлен эффект влияния размера цистрона *orfZ* на уровень трансляции гена *lacZ*. Показано, что уровень трансляции дистального гена *lacZ* зависит от потока рибосом с проксимального гена и имеет оптимальное значение, соответствующее определенному уровню потока рибосом, а величина этого оптимума определяется типом сопряжения цистронов.

**Ключевые слова:** сопряженная трансляция, эффективность трансляции, полицистронная мРНК, ген *lacZ*, поток рибосом.

Многие гены прокариот транслируются в составе полицистронных мРНК. Как правило, уровни синтеза продуктов этих генов сильно различаются [1, 2], что указывает на существование механизмов регуляции экспрессии генов, входящих в состав полицистронов. Основной точкой приложения механизмов регуляции на уровне трансляции является стадия инициации [3]. Известно, что эффективность трансляции мРНК определяется структурой района инициации трансляции [4–8] и доступностью его для связывания рибосомы [9–13]. При трансляции с полицистронной мРНК существует дополнительный регуляторный элемент – транслирующая рибосома, на что указывают многочисленные факты по изучению сопряженной трансляции: полярные мутации [4], изменения локальных вторичных структур мРНК под действием транслирующих рибосом, обеспечивающих более или менее эффективное функционирование района инициации трансляции [14–16], значитель-

ные различия в уровне экспрессии генов в зависимости от их взаимного расположения [17–21].

Ранее нами были исследованы особенности сопряженной трансляции в *E. coli* на модельных системах с искусственными полицистронными оперонами, содержащими тест-ген *lacZ*. В частности, было показано, что существует зависимость эффективности трансляции дистального гена полицистрона от уровня трансляции проксимального гена [15, 16]. Однако в описанных случаях различия эффективности трансляции проксимального гена полицистрона обеспечивались использованием разных проксимальных генов и были ограничены тремя значениями.

Целью данной работы было изучение характера зависимости эффективности трансляции дистального гена полицистрона от эффективности трансляции проксимального гена, т.е. от плотности потока рибосом. Для этого были сконструированы и исследованы серии плазмид pNSI, pNSII, pNLI и pNLII (рис. 1). На первом этапе были получены промежуточные конструкции p4S и p4L, включающие в свой состав ген *orfZ*, слитый с геном *lacZ*.

<sup>#</sup> Автор для переписки. E-mail: ilyichev@vector.nsk.su; тел.: (383-2)-64-79-16 (служебный).

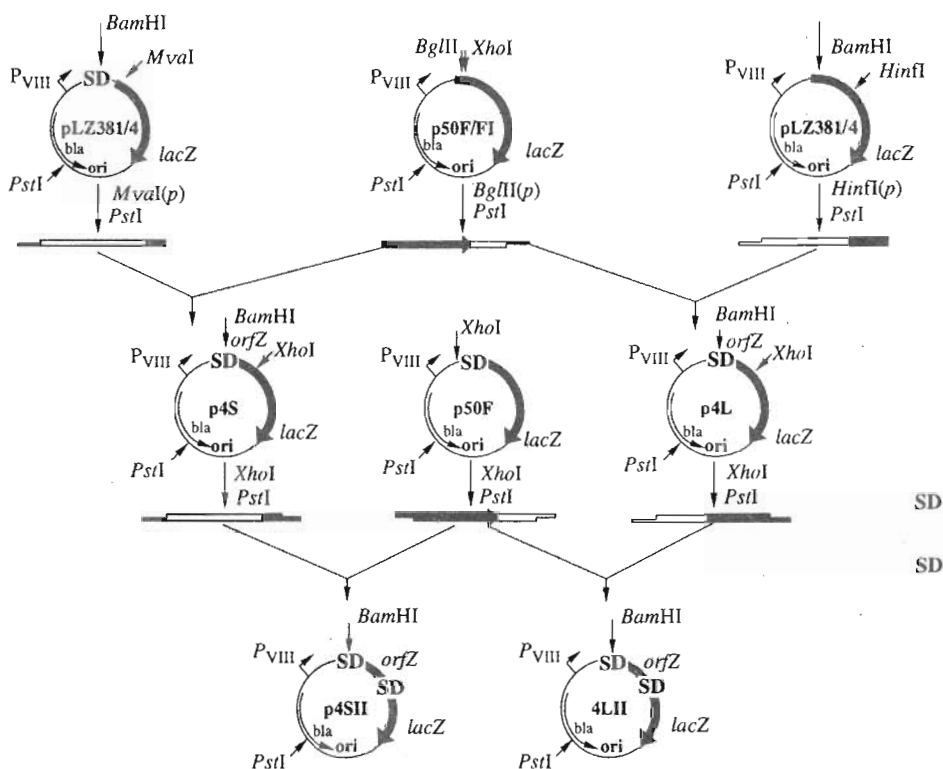


Рис. 1. Схема конструирования плазмид p4SII и p4LII (серии pNSI и pNLI соответственно). P<sub>VIII</sub> – промотор фага M13; *orfZ* – 5'-концевой фрагмент гена β-галактозидазы *E. coli*; *lacZ* – полусинтетический ген β-галактозидазы *E. coli*; *bla* – ген устойчивости к ампициллину; SD – синтетический сайт связывания рибосомы; (p) после названия эндонуклеазы рестрикции обозначает достраивание 3'-концов рестриционных фрагментов при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Стрелками указаны сайты рестрикции.

Для получения p4S плазмиду pLZ381/4 [19] расщепляли рестриктазой *MvaI*, 3'-концы достраивали при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, затем расщепляли рестриктазой *PstI* и полученный фрагмент длиной 1220 п. о. встраивали в плазмиду p50F/F1 [15], обработанную последовательно рестриктазой *BglII*, фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и рестриктазой *PstI*. Для получения плазмиды p4L плазмиду pLZ381/4 расщепляли рестриктазой *HinFI*, 3'-концы достраивали при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, затем расщепляли рестриктазой *PstI* и полученный фрагмент длиной 1520 п. о. встраивали в плазмиду p50F/F1, обработанную последовательно рестриктазой *BglII*, фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и рестриктазой *PstI*.

Аналогично получили промежуточные конструкции pMS и pML, исходя из плазмиды pLZ381/M [19]. Промежуточные конструкции p7S, p50S, p19S, p19L были получены путем замены *BamHI/PstI*-фрагмента в вариантах p4S и p4L на *BamHI/PstI*-фрагмент из плазмид pLZ381/7 [21], p50F/19A [15], pLZ381/19A [19] соответственно. Таким образом, были сконструированы две промежуточные серии плазмид, pNS (p7S, p19S, pMS, p4S, p50S) и pNL (p19L, pML, p4L), различающиеся

размером цистрона *orfZ* – 60 и 300 п. о. соответственно.

На следующем этапе конструирования были получены варианты плазмид I и II типов сопряжения цистронов pNSI (p7SI, p19SI, pMSI, p4SI, p50SI), pNLI (p19LI, pMLI, p4LI) и pNSII (p7SII, p19SII, pMSII, p4SII, p50SII), pNLI (p19LII, pMLII, p4LII), для чего в *XhoI/PstI*-векторные части плазмид p50F/*KpnI*- и p50F [15] (рис. 1) соответственно встраивали *XhoI/PstI*-фрагменты каждого из полученных промежуточных вариантов плазмид pNS и pNL. Общая схема плазмид всех четырех серий приведена на рис. 2. Они содержат полицистронные опероны под контролем промотора P<sub>VIII</sub> фага M13, обеспечивая синтез одинаковых количеств *lacZ*-специфической мРНК, что было показано для серии плазмид pLZ381N аналогичного строения [19]. Проксимальный цистрон *orfZ* представлен 5'-концевым фрагментом гена *lacZ* длиной 60 п. о. в сериях плазмид pNSI, pNSII и 300 п. о. в сериях плазмид pNLI, pNLI. В качестве дистального гена используется ген β-галактозидазы *E. coli*, что позволяет с помощью простого метода тестирования ферментативной активности β-галактозидазы определять количество синтезируемого продукта.



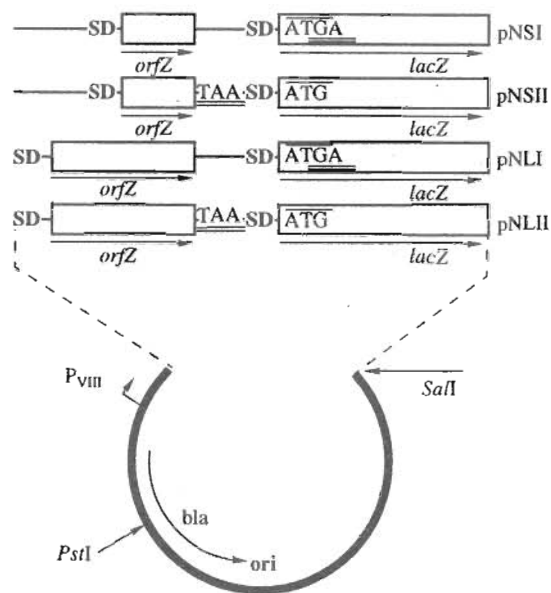


Рис. 2. Общая схема структурной организации плазмид серий pNSI, pNSII, pNLI и pNLII. Обозначения см. рис. 1. Терминирующий кодон подчеркнут двойной чертой, иницирующий отчеркнут сверху.

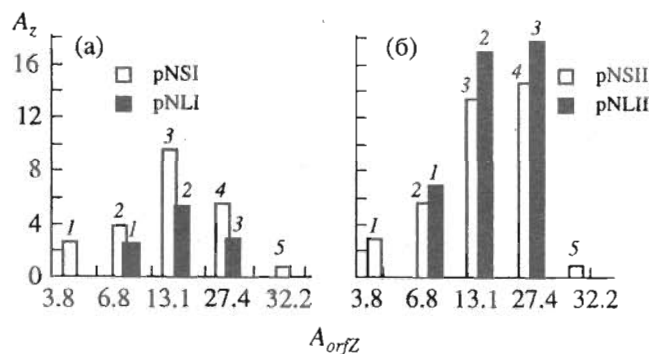


Рис. 3. Зависимость уровня трансляции дистального цистрона *lacZ* ( $A_z$ ) от плотности потока рибосом ( $A_{orfZ}$  [19]) в полицистронных конструкциях. (а): с I типом сопряжения цистронов (p7SI, p19SI, pMSI, p4SI, p50SI – белые прямоугольники 1–5 соответственно; p19LI, pMLI, p4LI – черные прямоугольники 1–3 соответственно); (б): со II типом сопряжения цистронов (p7SII, p19SII, pMSII, p4SII, p50SII – белые прямоугольники 1–5 соответственно; p19LII, pMLII, p4LII – черные прямоугольники 1–3 соответственно).

Взаимное расположение цистронов *orfZ* и *lacZ* в полицистронных мРНК серий плазмид pNSI, pNLI и pNSII, pNLII соответствуют I и II типам сопряжения цистронов: I тип – терминирующий кодон *orfZ* и иницирующий кодон *lacZ* перекрываются (pNSI, pNLI); II тип – терминирующий кодон цистрона *orfZ* расположен перед SD-сайтом *lacZ* (pNSII, pNLII). Междистронная область *orfZ-lacZ* и цистрон *orfZ* в каждом варианте полученных серий плазмид имеют идентичные структуры, а эф-

фективность трансляции цистрона *orfZ* различна и была определена ранее для исходных вариантов плазмид серий pLZ381N [19, 21] и p50FN [15], использованных при конструировании плазмид pNSI, pNLI и pNSII, pNLII. Таким образом, поток рибосом, образующийся при трансляции цистрона *orfZ*, является единственным фактором, который может влиять на различия в эффективности трансляции гена *lacZ* в полученных вариантах каждой серии плазмид.

Из таблицы, где представлены результаты определения ферментативной активности  $\beta$ -галактозидазы в клетках *E. coli* CSH36(F<sup>-</sup>), содержащих описанные плазмиды, можно видеть, что уровень синтеза  $\beta$ -галактозидазы меняется в зависимости от изменения приходящего потока рибосом (см. также рис. 3). При I типе сопряжения цистронов (серии pNSI, pNLI) с увеличением потока рибосом до 13.1 условных единиц наблюдается увеличение уровня трансляции гена *lacZ*, а затем его падение. Очевидно, существует некое оптимальное значение плотности потока рибосом с цистрона *orfZ*, которое соответствует максимальному значению эффективности трансляции гена *lacZ* в полицистронной мРНК заданной структуры. При дальнейшем увеличении плотности потока рибосом, вероятно, возрастает отрицательное влияние транслирующего первый цистрон рибосом на инициацию трансляции гена *lacZ*. Необходимо отметить, что увеличение размера цистрона *orfZ* в pNLI-вариантах приводит в данном случае к подавлению синтеза  $\beta$ -галактозидазы по сравнению с pNSI-вариантами. Это может быть связано с увеличением заселенности мРНК рибосомами по мере их продвижения вдоль матрицы от начала гена *orfZ* к его концу (или, что эквивалентно, к району инициации трансляции гена *lacZ*), поскольку скорость их движения может зависеть от стабильности локальных вторичных структур кодирующей последовательности [22]. В этом случае мы наблюдаем, по-видимому, возрастание влияния отрицательного взаимодействия транслирующих проксимальный цистрон рибосом и рибосом, иницирующих трансляцию дистального гена.

При II типе сопряжения цистронов (серии pNSII, pNLII) эффективность трансляции *lacZ* выше, чем при I типе для каждого варианта, и увеличение эффективности трансляции гена *lacZ* наблюдается вплоть до значения плотности потока рибосом 27.4 условных единиц [19]. Затем, при значении плотности потока рибосом 32.2 единиц, также наблюдается резкое падение уровня трансляции *lacZ* до единицы (p50SII). В этом случае, по-видимому, относительный вклад отрицательной интерференции между транслирующими и иницирующими рибосомами в экспрессию тест-гена уменьшается по сравнению с аналогичными вариантами I типа сопряжения цистронов. В противоположность данным, полученным для I типа

Зависимость уровня трансляции дистального цистрона *lacZ* от плотности потока рибосом в полицистронных конструкциях I и II типа сопряжения цистронов\*

$A_{orfZ}$	Плазмида	$X \pm S$	$A_Z$	Плазмида	$X \pm S$	$A_Z$
3.8	p7SI	925 ± 40	2.6	p7SII	1072 ± 45	3.0
6.8	p19SI	1387 ± 55	3.9	p19SII	2037 ± 105	5.7
13.1	pMSI	3388 ± 145	9.6	pMSII	4370 ± 174	12.4
27.4	p4SI	1945 ± 93	5.5	p4SII	5149 ± 180	14.6
32.2	p50SI	247 ± 15	0.7	p50SII	352 ± 33	1.0
6.8	p19LI	880 ± 84	2.5	p19LII	2464 ± 230	7.0
13.1	pMLI	1900 ± 175	5.4	pMLII	5984 ± 560	17.0
27.4	p4LI	1091 ± 105	3.1	p4LII	6336 ± 590	18.0

\*  $A_{orfZ}$  – уровень трансляции цистрона *orfZ* в относительных единицах (плотность потока рибосом), значения приведены по данным работ [15, 19, 21];  $A_Z$  – уровень трансляции цистрона *lacZ* (активность β-галактозидазы) в относительных единицах [19]; за единицу принимается активность β-галактозидазы, синтезируемой в клетках *E. coli* с плазмидой pLZ381/F [19];  $X$  – среднее значение активности β-галактозидазы в единицах Миллера [23];  $S$  – стандартная ошибка.

сопряжения цистронов, в случае полицистронов II типа увеличение размера *orfZ* (варианты pNLII) приводит к возрастанию эффективности трансляции *lacZ* по сравнению с аналогичными вариантами pNSII.

На наш взгляд, характер зависимости эффективности экспрессии дистального гена при изменениях плотности потока рибосом с проксимального гена в полицистронных мРНК разных типов трансляционного сопряжения может быть обусловлен механизмом формирования инициаторного комплекса, что было описано ранее в работе [15]. Так, в полицистромах с трансляционным сопряжением II типа посттерминировавшая рибосома или ее 30S-субъединица, которая после терминирования трансляции некоторое время может оставаться связанной с матрицей [4], возможно, формирует и поддерживает определенное состояние инициаторного сайта дистального гена, в котором свободные рибосомы могут многократно инициировать трансляцию. В полицистромах с трансляционным сопряжением I типа в силу пространственных ограничений (перекрывание иницирующего и терминирующего кодонов) многократное использование 30S-субъединицы как фактора активации сайта инициации трансляции дистального гена исключено, и формирование инициаторного комплекса возможно по типу реинициации [15, 17–19]. Предложенный механизм в целом объясняет наблюдаемые различия в уровне экспрессии дистального гена полицистрома в вариантах плазмид, различающихся типом сопряжения цистронов. Полученные в данной работе результаты указывают также на существование феномена отрицательного влияния усиления потока рибосом с проксимального гена на эффективность трансляции дистального гена, однако оценить его количественный вклад в рамках опи-

санной модельной системы не представляется возможным.

Таким образом, в данной работе были созданы серии плазмид с модельным полицистронным опероном для исследования роли потока рибосом с проксимального гена в регуляции трансляции дистального гена *lacZ*. Выявлен эффект влияния размера и соответственно структуры проксимального цистрона на уровень трансляции дистального гена *lacZ*. Показано, что уровень трансляции дистального гена полицистрома зависит от потока рибосом с проксимального гена и имеет оптимальное значение, соответствующее определенному уровню потока рибосом, а величина этого оптимума определяется типом сопряжения цистронов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штамм *E. coli* CSH36(F<sup>-</sup>) [23], плазмиды pLZ381/4, pLZ381/M, pLZ381/19A [19], pLZ381/7 [21], p50F/19A, p50F/F1, p50F/KpnI<sup>-</sup>, p50F [15]. Рестриктазы *Hinf*I, *Mva*I, *Xho*I, *Bgl*III, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II, *Hae*III, дезоксирибонуклеотида, препараты ДНК-лигазы фага T4, фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* ("Сибэнзим", Новосибирск); ампициллин, *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид, 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид (X-Gal), ATP (Sigma, США); пептон, дрожжевой экстракт (Difco, США).

Условия обработки ДНК ферментами при получении рекомбинантных плазмид *in vitro*, электрофоретическое разделение ДНК в полиакриламидном геле, выделение фрагментов из геля, трансформация клеток *E. coli* плазмидами, выделение ДНК описаны в работе [24]. Активность β-галактозидазы в клетках *E. coli* CSH36(F<sup>-</sup>), несущих различные варианты плазмид, определяли в соответствии с протоколом эксперимента, описанным в работе [19].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yates J.L., Arfstein A.E., Nomura M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 1837–1841.
2. Mooi F.R., Classen I., Bakker D., Kuipers H., Graaf F. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 2443–2457.
3. Спириин А.С. Молекулярная биология: структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. школа, 1986.
4. Кравченко В.В., Шамин В.В., Гилева И.П. Роль структуры мРНК в регуляции биосинтеза белка у прокариот: Генная инженерия, молекулярная биология, селекция промышленных микроорганизмов: Обзорная информация. М.: ВНИИСЭНТИ, 1990. Вып. 1.
5. Shine J., Dalgarno L. // Nature. 1975. V. 254. P. 34–38.
6. Гуревич А.И., Есипов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 117–123.
7. Galogero R.A., Cynthia L.P., Canonako M.A., Guallerzi C.O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 5. P. 6427–6431.
8. Chen H., Bjerknes M., Kumar R., Jay E. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 4953–4957.
9. Ganoza M.C., Marliere P., Koford E.C., Lois B.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 4587–4591.
10. McCarty J.E.G., Bokelmann C. // Mol. Microbiol. 1988. V. 2. P. 455–466.
11. Shauder B., McCarty J.E.G. // Gene. 1989. V. 78. P. 59–72.
12. Smit M.H., Van Duin J. // J. Mol. Biol. 1994. P. 244. P. 144–150.
13. Barrick D., Villanueva K., Childs J., Kalil R., Schneider T.D., Lawrence C.E., Gold L., Stormo G.D. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 1287–1295.
14. Berkhout B., Van Duin J. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. P. 6955–6967.
15. Кравченко В.В., Шамин В.В., Гилева И.П., Лихошвай В.А., Корженевский С.К., Добрынин В.Н., Филиппов С.А., Чувпило С.А., Коробко В.Г. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 1661–1669.
16. Николенко Г.Н., Кравченко В.В. // Мол. генет., микробиол., вирусол. 1996. С. 28–32.
17. Машко С.В., Липидус А.Л., Трухан М.Э., Стащук Н.А., Дебабов В.Г. // Молекулярная биология. 1987. Т. 21. С. 1310–1321.
18. Oppenheim D.S., Yanovsky C. // Genetics. 1980. V. 95. P. 785–795.
19. Кравченко В.В., Шамин В.В., Гилева И.П., Лихошвай В.А., Добрынин В.Н., Филиппов С.А., Коробко В.Г. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. С. 1372–1386.
20. Shoner B.E., Belagage R.M., Shoner R.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 8506–8510.
21. Кравченко В.В., Шамин В.В., Гилева И.П., Лихошвай В.А., Добрынин В.Н., Филиппов С.А., Коробко В.Г. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 301. С. 480–483.
22. Yamamoto T., Suyama A., Mori N., Yokota T., Wada A. // FEBS Lett. 1985. V. 181. P. 377–380.
23. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976.
24. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

## Regulation of Translation of the Distal *lacZ* Gene in Polycistronic mRNA by the Ribosome Stream From a Proximal Gene

G. N. Nikolenko\*, V. V. Kravchenko\*, E. S. Svarovskaya\*,  
I. P. Gileva\*, V. A. Likhoshvai\*, and V. G. Korobko\*\*

\* Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

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

**Abstract**—Four series of plasmids (pNSI, pNSII, pNLI, and pNLII) with artificial polycistrons containing the *lacZ* test gene were constructed. These plasmids coded for polycistronic mRNAs with two different types of cistron (*orfZ* and *lacZ*) coupling: in pNSI and pNLI, the *orfZ* termination codon and the *lacZ* initiation codon overlapped (type I); in pNSII and pNLII, the *orfZ* termination codon was located upstream of the *lacZ* SD sequence. The length of the *orfZ* cistron was 60 bp in pNSI and pNSII or 300 bp in pNLI and pNLII. Plasmids with the same type of cistron coupling contained the same *lacZ* translation initiation region, whereas the structure of the *orfZ* translation initiation region varied, thereby providing varying efficiency of the *orfZ* gene translation. The effect of these variations on the efficiency of the *lacZ* gene translation was evaluated by direct measurement of the  $\beta$ -galactosidase activity in *Escherichia coli* cells transformed with the corresponding plasmids. We found that the level of translation of the distal *lacZ* gene depended on the ribosome stream from the proximal gene and was maximal at the optimal ribosome stream level, which, in turn, depended on the type of cistron coupling.

**Key words:** coupled translation, translation efficiency, polycistronic mRNA, *lacZ* gene, ribosome stream.