



УДК 577.217.35

## РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА РИБОСОМНОГО БЕЛКА L7/12: РОЛЬ МЕЖЦИСТРОННОЙ ОБЛАСТИ *rplJL* КАК УСИЛИТЕЛЯ ТРАНСЛЯЦИИ

© 1998 г. В. С. Артамонова, Н. В. Царева, И. В. Бони<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 01.12.97 г. Принята к печати 21.01.98 г.

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* исследована способность межцистронной области *rplJL* *Escherichia coli* обеспечивать эффективную инициацию синтеза рибосомного белка L7/12, единственного рибосомного компонента, представленного в структуре рибосом не одной, а четырьмя копиями. Показано, что для высокой активности данной области в инициации трансляции необходимы структурные детерминанты, расположенные в 5'-сторону от домена Шайна–Дальгарно и по нуклеотидному составу напоминающие известные трансляционные усилители (энхансеры) *E. coli*. Получены данные о том, что в образовании трансляционного инициаторного комплекса важную роль играют мРНК-белковые взаимодействия с участием рибосомного белка S1, мишенью которого является трансляционный энхансер в лидерной области мРНК белка L7/12.

*Ключевые слова:* *rplL* мРНК, инициация трансляции, трансляционные усилители.

Оперон *rplJL-rpoBC* *Escherichia coli* включает гены рибосомных белков L10 и L7/12 (*rplJ* и *rplL*) и двух субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы –  $\beta$  и  $\beta'$  (*rpoB* и *rpoC*) [1, 2]. Белковый синтез, направляемый данной транскрипционной единицей как *in vivo*, так и *in vitro*, приводит к соотношению продуктов 1 : 4 : 0.2 : 0.2 (в порядке расположения генов в опероне *rplJ-rplL-rpoB-rpoC*) [2]. Это имеет глубокий физиологический смысл, так как белок L7/12 является единственным исключением из правила эквимоллярности рибосомных компонентов и представлен в структуре рибосом четырьмя копиями. Понижение уровня синтеза субъединиц РНК-полимеразы по сравнению с синтезом рибосомных белков объясняется присутствием в межгенной области *rplL-rpoB* аттенуатора, на котором обрывается синтез около 80% транскриптов, иницированных с сильного промотора перед геном *rplJ* [3]. В то же время механизм усиления трансляции цистрона белка L7/12 по сравнению с предыдущим цистроном белка L10 остается неясным.

В литературе обсуждалось несколько моделей. В частности, предполагалось наличие дополнительного промотора в структурной части гена L10,

что должно приводить к повышению уровня синтеза мРНК L7/12 относительно мРНК L10 [4]. Однако показано, что такой дополнительный промотор если и есть, то очень слабый, а мРНК белков L10 и L7/12 представлены в клетке в эквимоллярном соотношении [5], следовательно, соотношение белков 1 : 4 достигается, скорее всего, на трансляционном или посттрансляционном уровне.

Как в составе рибосомы, так и вне ее белки L10 и L7/12 функционируют в виде прочного комплекса, в котором одна молекула L10 связана с четырьмя молекулами (двумя димерами) белка L7/12. Этот комплекс играет важную регуляторную роль в аутогенном контроле на уровне трансляции, связываясь с операторным участком в лидерной части мРНК *rplJL* и одновременно репрессируя синтез обоих рибосомных белков [2, 6]. Связывание репрессорного комплекса блокирует инициацию синтеза белка L10, а при отсутствии трансляции первого цистрона возможно образование структуры, ингибирующей синтез белка L7/12 за счет дальних взаимодействий между свободной от рибосом кодирующей областью *rplJ* и инициаторным районом *rplL* [7]. Такое трансляционное сопряжение, когда рибосомсвязывающие сайты функционируют только при условии трансляции предыдущего цистрона, установлено для многих оперонов рибосомных белков (для обзора см. [8]). Важным следствием этого является невозможность увеличения выхода белка L7/12 относительно белка L10 за счет избирательного ингибирования синтеза последнего. Показано также, что вне комплекса с L7/12 белок L10 в

Сокращения: SD – последовательность Шайна–Дальгарно; IPTG – изопропил- $\beta$ -D-тиогаляктопиранозид; X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид; ONPG – *o*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел./факс: (7-095) 330-65-38, e-mail: irina@humgen.siobc.ras.ru).

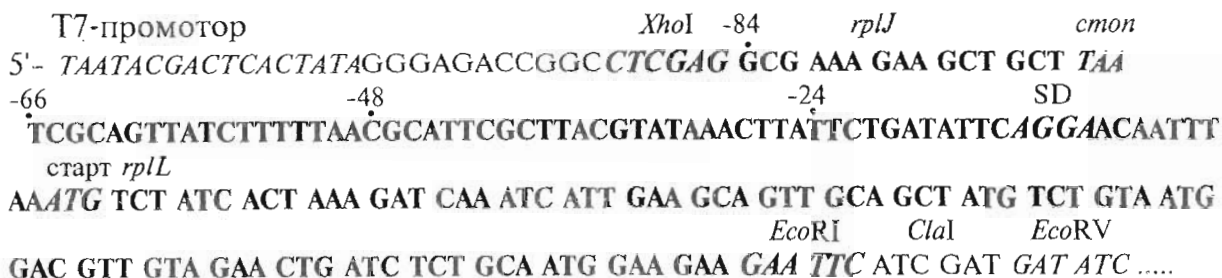


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность вставки и фланкирующих областей плазмиды pSL712. Указаны: курсивом – T7-промотор вектора pSP73 и рестриктные сайты (*XhoI* и *EcoRI*), использованные для клонирования ПЦР-фрагмента, включающего в себя конец гена *rplJ*, межцистронную область *rplJL* (66 нт) и начало гена *rplL* (отмечены жирным шрифтом); стоп-кодон *rplJ*, последовательность Шайна–Дальгарно (SD) и стартовый кодон *rplL*. Разбивка на триплеты отвечает трансляционной рамке, цифры над последовательностью соответствуют позиции отмеченного точкой нуклеотида относительно первой буквы (+1) стартового кодона *rplL*, позиции –84, –48 и –24 соответствуют 5'-концам лидеров *rplL* в конструкциях для экспериментов *in vivo*. *EcoRV* – рестриктный сайт из полилинкера вектора pSP73, использованный для клонирования в рамке с *lacZ*-последовательностью вектора pEMBL46.

клетке протеолитически нестабилен, однако не в такой степени, чтобы за счет этого достигался баланс 1 : 4 [9]. Таким образом, остается предположить, что информация о синтезе белков L10 и L7/12 в соотношении 1 : 4 должна быть закодирована в структуре самой *rplJL* мРНК.

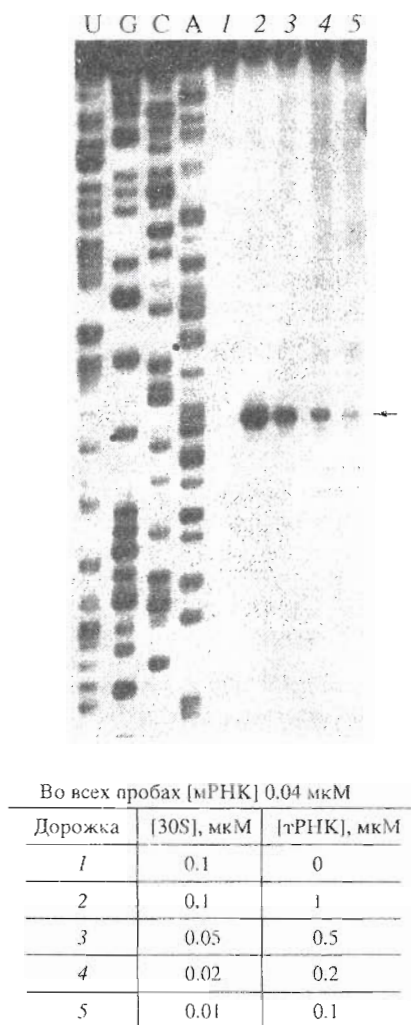
Подобная ситуация с неравным выходом продуктов трансляции разных цистронов одной полицистронной мРНК в клетке далеко не уникальна. В качестве примера можно привести *atp* (*unc*)-оперон *E. coli*, кодирующий субъединицы протон-транслоцирующей АТФ-синтазы ( $H^+$ -АТФазы), которые входят в состав ферментативного комплекса в разном стехиометрическом соотношении:  $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1a_1b_2c_{10-15}$ . Различие в уровнях синтеза каждой субъединицы соответствует стехиометрической формуле и связано с разной скоростью инициации трансляции на разных цистронах одной полицистронной мРНК [10]. В частности, было найдено, что высокая эффективность трансляции гена *atpE*, кодирующего субъединицу *c*, обусловлена присутствием в межцистронной области *atpB-atpE* так называемого усилителя трансляции (энхансера) – U/A-богатого элемента мРНК, расположенного в 5'-сторону от домена Шайна–Дальгарно (SD) [10]. Можно предположить, что в случае синтеза белков L10 и L7/12 имеет место аналогичная ситуация и что трансляционный инициаторный район мРНК *rplL* содержит сигналы трансляционного усиления, повышающие скорость инициации трансляции. В данной работе мы приводим результаты экспериментов по оценке эффективности инициации синтеза белка L7/12, направляемой межцистронной областью *rplJ-rplL* и ее укороченными вариантами *in vitro* и *in vivo*.

Фрагмент ДНК *E. coli*, включающий в себя конец гена *rplJ* (6 кодонов), межцистронную область *rplJ-rplL* (66 п. о.) и начало *rplL*-гена (29 кодонов), был получен с помощью ПЦР на геномной ДНК с

применением пары праймеров, в которые для удобства клонирования были введены участки узнавания для эндонуклеаз рестрикции *XhoI* и *EcoRI*. Продукт ПЦР был клонирован в векторе pSP73 (Promega), в результате чего была получена плаزمида pSL712, содержащая клонированный фрагмент ДНК под контролем T7-промотора (рис. 1). Синтезированный *in vitro* РНК-транскрипт по результатам секвенирования полностью соответствовал запланированной последовательности.

Активность полученной *in vitro* РНК в инициации трансляции была тестирована методом тоупринтинга (toeprinting), который, как известно, позволяет оценить эффективность образования тройного инициаторного комплекса между рибосомой, мРНК и инициаторной тРНК [11]. В системе обратной транскрипции при удлинении меченного  $^{32}P$  праймера синтез кДНК тормозится связанной с мРНК рибосомой и при анализе кДНК-продуктов в структурном ПААГ в месте остановки обратной транскриптазы виден стоп-сигнал (тоупринт), положение которого соответствует позиции +16 от первой буквы инициаторного кодона, т.е. позиции +1 (иногда эту позицию принимают за 0, в этом случае тоупринт соответствует позиции +15). Соотношение интенсивностей сигналов тоупринт/полноразмерный транскрипт отражает равновесное содержание инициаторного трансляционного комплекса в реакционной смеси и может служить мерой активности исследуемой РНК в инициации трансляции. Как видно из рис. 2, полученный РНК-транскрипт, содержащий инициаторный район мРНК белка L7/12, активен в инициации трансляции *in vitro* и генерирует тоупринт-сигнал в широком диапазоне концентраций 30S рибосомных субчастиц.

Влияние лидерной последовательности РНК-транскрипта на эффективность образования инициаторного комплекса было изучено с помощью

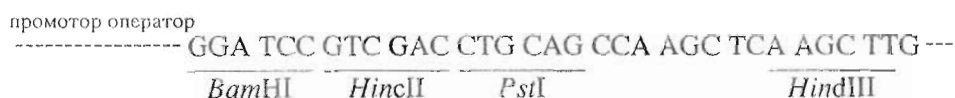


**Рис. 2.** Образование 30S инициаторного комплекса на полученной *in vitro* мРНК белка L7/12 (тоупринт-анализ). Авторадиограмма 8% ПААГ. G, A, U, C – си-квенные дорожки, на A-дорожке точкой отмечена первая буква инициаторного кодона A+1, на G-дорожке – положение тоупринт-сигнала G+16. 1–5 – обратная транскрипция в присутствии компонентов инициаторного комплекса, концентрации которых указаны внизу рисунка. Тоупринт-сигнал отмечен стрелкой.

модифицированного варианта того же подхода. Полученную *in vitro* РНК гидролизовали рибонуклеазой T2 (вносит разрывы в неструктурированные участки РНК, малоспецифична к основаниям) в условиях статистического расщепления, что контролировалось с помощью обратной транскрипции продуктов гидролиза. В результате был получен набор фрагментов РНК разной длины, вклю-

чая полноразмерный транскрипт (рис. 3, 1). Тоупринт-анализ с применением полученного статистического гидролизата в качестве мРНК выявил те фрагменты, которые активны в образовании 30S-инициаторного комплекса – иными словами, которые содержат достаточно информации, чтобы 30S рибосомная субчастица в присутствии инициаторной тРНК могла узнать и связать инициаторный кодон. Аналогичный подход ранее был использован для анализа лидерных областей РНК генов 32 фага T4 [12] и *rpsA E. coli* (Царева Н.В., Артамонова В.С., Бони И.В., неопубликованные данные). В таком варианте тоупринтинга сигналы фрагментов, способных к формированию 30S-инициаторного комплекса, должны ослабевать (переходить в тоупринт-сигнал), а интенсивность неактивных фрагментов оставаться без изменения. Как видно из рис. 3, все фрагменты с длиной лидерной части более 23–24 нт способны генерировать тоупринт-сигнал, в то время как фрагменты с лидерной частью короче 18 нт (между позициями –18 и –23 отсутствуют сайты расщепления T2) в образовании инициаторного комплекса неактивны, несмотря на то что содержат интактный домен SD. Характер расщепления РНК-транскрипта РНКазой T2 (рис. 3, 1) позволяет сделать вывод, что район мРНК L7/12, предшествующий инициаторному кодону, и начало кодирующей области характеризуются практически полным отсутствием вторичной структуры, они односпиральны, что является отличительным признаком активных рибосомсвязывающих участков [13].

Полученные *in vitro* результаты о важной роли информации, закодированной в последовательности межцистронной *rplJL*-области перед SD-доменом, для эффективной инициации синтеза белка L7/12 были подтверждены *in vivo* с применением подхода, описанного в работе [14]. Была создана плазмидная конструкция, в которой синтез  $\alpha$ -пептида  $\beta$ -галактозидазы управляется на транскрипционном уровне элементами *lac*-оперона (промотором и оператором), а на трансляционном – регуляторной областью гена *rplL*, соединенной с кодирующей частью *lacZ*-гена с сохранением рамки считывания. Для этой цели *XhoI-EcoRV*-фрагмент из плазмиды pSL712 (рис. 1) после достройки *XhoI*-конца был клонирован в векторе pEMBL46, в котором делегирован рибосомсвязывающий участок *lacZ* и введен ряд рестриктных сайтов, удобных для клонирования в рамке с *lacZ*-геном [14]:



В приведенном фрагменте последовательности плазмиды pEMBLΔ46 обозначены рестриктные сайты, введенные в начало *lac*-области, а разбивка на триплеты соответствует трансляционной рамке *lacZ*. В соответствии с таким расположением сайтов рестрикции клонирование *XhoI-EcoRV*-фрагмента плазмиды pSL712 по *HincII*-сайту привело к желаемой конструкции, названной pEL712-84. В полученной плазмиде регуляторная область гена *rplL* слита с последовательностью *lacZ* с сохранением рамки считывания, что доказано секвенированием (в дополнение к тесту на α-комплементацию).

На основе плазмиды pEL712-84 были получены варианты pEL712-48 и pEL712-24, в которых лидерная область перед трансляционным стартом *rplL* была укорочена с 84 до 48 и 24 п. о. соответственно (см. рис. 1). Для этого плазмиды pEL712-84 была обработана эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI, а затем экзонуклеазой *Bal*31 в контролируемом временном режиме (см. "Экспериментальную часть"), после чего проводили рестрикцию *Hind*III. Полученные в результате фрагменты ДНК, соответствующие исследуемой регуляторной области гена белка L7/12, но с укороченной 5'-концевой последовательностью, были вновь клонированы в плазмиде pEMBLΔ46 по *HincII/Hind*III-сайтам. Для трансформации использовался штамм *E. coli* JM101 и трансформанты отбирались по тесту на α-комплементацию, т.е. отбирались колонии, содержащие плазмиды с активной в синтезе α-пептида *LacZ* регуляторной областью *rplL*. По результатам анализа длины *Bam*HI-*Hind*III-вставок в агарозном геле были выбраны две плазмиды, в одной из которых была самая короткая вставка, а в другой – вставка "средней" (между минимальной и исходной) длины (данные не приведены). Секвенирование показало, что короткая вставка соответствует длине *rplL*-лидера 24 п. о., а средняя – 48 п. о. (это отражено в названии соответствующих плазмид: pEL712-24 и pEL712-48). Таким образом, уже на этом этапе эксперимента *in vivo* была получена информация, подтверждающая выводы из экспериментов *in vitro*, что минимальная длина активной в трансляции лидерной части *rplL*-гена составляет около 20 нт.

Далее плазмиды pEL712, содержащие *rplL*-лидеры различной длины (84, 48 и 24 п. о.), использовались для трансформации штамма *HfrG6Δlac12* (*Lac*<sup>-</sup>) *E. coli*, в котором область инициации трансляции гена *lacZ* делетирована [14]. В результате гомологичной рекомбинации между плазмидной *lac*-областью и хромосомной регуляторные участки *rplL* из плазмид pEL712 встраивались в хромосому, что приводило к *Lac*<sup>+</sup>-фенотипу. В отобранных *Lac*<sup>+</sup>-рекомбинантах, в которых синтез β-галактозидазы осуществляется под трансляционным контролем *rplL*-лидеров разной длины, была измерена активность β-галактозидазы с использованием

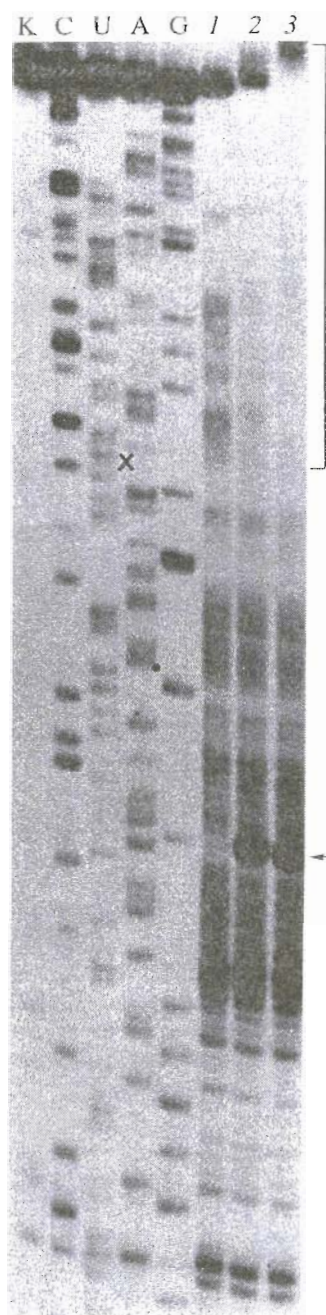
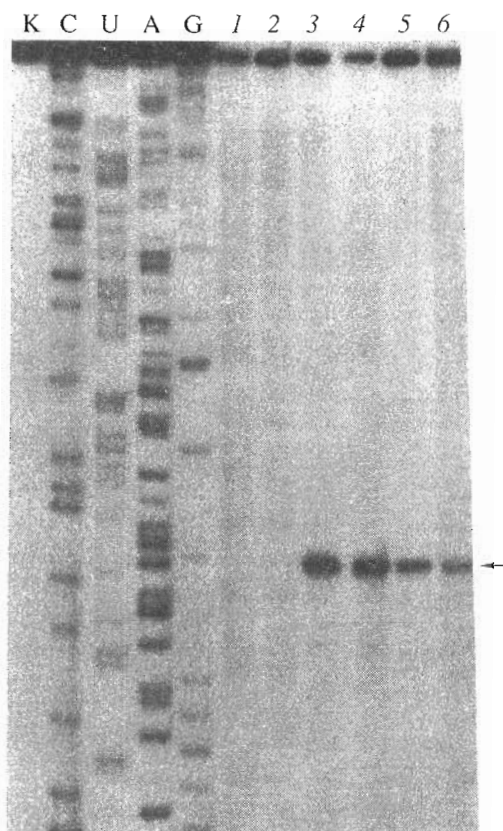


Рис. 3. Тоупринт-анализ на статистическом гидролизате *rplL* мРНК, полученном при обработке РНКазой T2. Авторадиограмма 8% ПААГ. С, U, A, G – сиквенные дорожки, К – обратная транскрипция на мРНК, не обработанной РНКазой T2 (контроль на интактность РНК). 1–3 – обратная транскрипция на статистическом гидролизате мРНК в отсутствие (1) и в присутствии компонентов инициаторного комплекса (2, 3). Концентрации компонентов в пробах (мкМ): мРНК – 0.8 (1–3), 30S субчастиц рибосом – 0 (1), 0.1 (2) и 0.4 (3); тРНК – 0 (1), 0.5 (2) и 2.0 (3). Стрелкой отмечено положение тоупринт-сигнала (G+16), точкой – позиция A + 1, крестиком (x) – позиция U-24, соответствующая 5'-концу самого короткого *rplL*-лидера, способного обеспечивать образование тройного инициаторного комплекса; вертикальная черта справа объединяет сигналы, соответствующие 5'-концам всех фрагментов РНК, активных в тоупринтинге.



**Рис. 4.** Зависимость образования инициаторного комплекса на мРНК L7/12 от присутствия белка S1 (тоупринт-анализ). Авторадиограмма 8% геля. К – обратная транскрипция на мРНК в отсутствие компонентов инициаторного комплекса. С, А, U, G – сиквенсные дорожки. 1–6 – тоупринт-анализ с использованием 30S рибосомных субчастиц, не содержащих белок S1 (0.4 мкМ в каждой пробе). Концентрации остальных компонентов инициаторного комплекса (мкМ): мРНК – 0.04 (1–6), тРНК – 0 (1) и 4 (2–6), белка S1 – 0 (1, 2), 0.2 (3), 0.4 (4), 0.8 (5) и 1.6 (6). Тоупринт-сигнал отмечен стрелкой.

*o*-нитрофенил-β-*D*-галактопиранозида (ONPG) в качестве субстрата [15] (таблица).

Как видно из таблицы, последовательное укорачивание 5'-концевой последовательности ли-

β-Галактозидазная активность производных штамма HfrG6, полученных в данной работе

Длина 5'-нетранслируемой области <i>rplL</i> (нт) перед гибридным геном <i>lacZ</i>	Активность RplL'-LacZ-гибрида*
84	9700 ± 1500
48	5200 ± 750
24	2400 ± 250

\* Активность β-галактозидазы во фракции растворимых клеточных белков выражена в количестве *o*-нитрофенил-β-*D*-галактопиранозида (нмоль), гидролизуемого в 1 мин 1 мг тотального клеточного белка (нмоль ONPG/мин/мг белка). Подробности методики описаны в работе [24].

дерной области гена белка L7/12 перед гибридным геном *rplL'*-*lacZ* приводит к понижению ее активности в трансляции и более низкому уровню синтеза гибридной β-галактозидазы, несущей на N-конце N-концевую последовательность белка L7/12. Таким образом, можно сделать вывод, что последовательность в 5'-сторону от домена Шайна–Дальгарно мРНК белка L7/12 играет роль трансляционного усилителя *in vivo*, что подтверждает предположение, сделанное на основе данных *in vitro* (см. выше).

Молекулярные механизмы, лежащие в основе трансляционного усиления, пока еще точно не установлены. Предполагалось, что последовательности-усилители (translational enhancers) могут образовывать комплементарные дуплексы с некоторыми районами 16S рРНК (аналогично последовательности Шайна–Дальгарно) и такие дополнительные комплементарные мРНК-16S рРНК-взаимодействия могут повышать сродство мРНК к рибосоме и, как следствие, эффективность инициации трансляции [16]. Высказывалось также предположение о роли энхансерных U/A-богатых последовательностях в минимизации локальной структуры мРНК в районе связывания рибосомы [17].

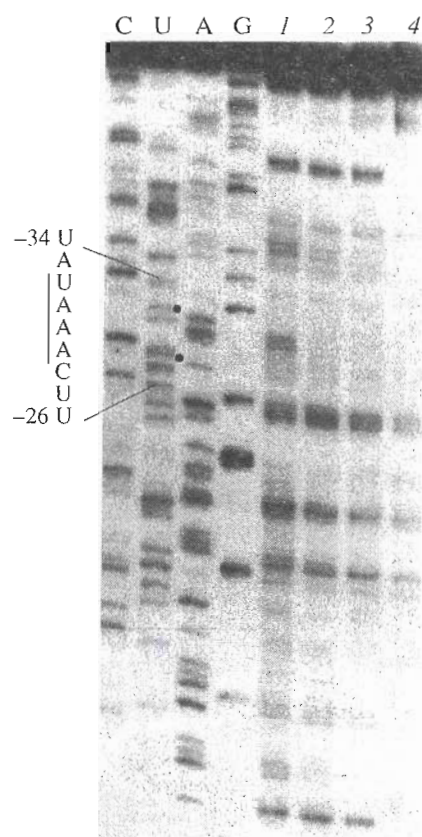
В нашей группе ранее была предложена и подтверждена на ряде мРНК гипотеза о том, что трансляционные усилители в лидерах служат мишенями для мРНК-связывающего компонента 30S рибосомных субчастиц – рибосомного белка S1 [18, 19]. Чтобы проверить, насколько эта гипотеза оправдана в случае лидерной последовательности мРНК белка L7/12, для тоупринтинга были использованы РНК-транскрипт, синтезированный с T7-промотора плазмиды рSL712, и 30S рибосомные субчастицы, не содержащие рибосомного белка S1 (рис. 4). Отсутствие тоупринт-сигнала ясно говорит о невозможности формирования инициаторного комплекса в этих условиях (рис. 4, 2). При добавлении свободного белка S1 появляется тоупринт-сигнал, максимальная интенсивность которого соответствует эквимольному соотношению S1/(30S-S1), однако избыток белка S1 оказывает ингибирующее действие на процесс связывания рибосомы с мРНК и тоупринт ослабляется (рис. 4, 3–6). Так как свободный белок S1 и белок, связанный с рибосомой, имеют одинаковую РНК-связывающую специфичность [20], логично предположить, что в данном случае имеет место конкуренция и связывание свободного белка S1 экранирует участки на мРНК, важные для узнавания рибосомой.

Чтобы выяснить, какие участки экранируются белком S1, проводили футпринт-анализ (footprinting) аналогично ранее описанному в работах [18, 19]. Пробы, содержащие свободный РНК-транскрипт или его комплекс с белком S1, обрабатывали рибонуклеазой T2 в условиях статисти-

ческого расщепления и полученные фрагменты анализировали в системе обратной транскрипции с меченым праймером (рис. 5).

С помощью этого подхода в лидерной последовательности мРНК белка L7/12 был найден район, защищенный белком S1 от РНКазы T2 (рис. 5). Это последовательность UAUAACUUA (позиции от -34 до -26), в которой расщепление триплета AAA в присутствии белка S1 заметно ослабевает, хотя и в самом препарате белка явно имеются следы рибонуклеаз. Таким образом, этот участок можно рассматривать как мишень для белка S1, связанного с рибосомой, а его отсутствие в хромосомной конструкции с *rplL*-лидером длиной 24 нт – как причину уменьшения эффективности синтеза гибридной  $\beta$ -галактозидазы по сравнению с конструкцией с лидером длиной 48 нт (см. таблицу). Интересно, что аналогичный футпринтинг длинной лидерной области мРНК гена *rpsA*, кодирующего сам белок S1, показал наличие в нем сходных по последовательности S1-мишеней (выделены жирным шрифтом) – UUAAAUAUAAC, UUAACAU, UUAACAA (Царева Н.В., Артамонова В.С., Бони И.В., неопубликованные данные).

В то же время футпринт-эксперимент на рис. 5 не обнаружил других явных участков взаимодействия белка S1 в лидере *rplL*, поэтому мы не можем утверждать, что совокупный усилительный эффект можно целиком отнести на счет преимуществ эффективного связывания этим белком. Возможно, что в последовательности рассматриваемой области (рис. 1) имеются и другие усилительные элементы, работающие по другим механизмам. В частности, обязательное для проявления рибосомсвязывающей активности (хотя и ослабленной) присутствие последовательности, расположенной непосредственно перед SD-доменом (самый короткий активный *rplL*-лидер, по данным *in vivo*, имеет длину 24 нт), скорее всего, не связано с РНК-белковыми взаимодействиями, а вероятно, заключает в себе дополнительные возможности комплементарного спаривания с 16S рРНК. Например, усилительные свойства таких коротких элементов, как UGAU (позиции от -21 до -18 в последовательности *rplL*-лидера), теоретически предполагались в работе [21]. Почти двукратное уменьшение эффективности *rplL*-лидера при его укорачивании от 84 до 48 нт (таблица), возможно, также не связано с потерей S1-мишеней (хотя для строгого утверждения необходимы дополнительные эксперименты по футпринтингу с различными реагентами). В то же время в делетированной последовательности прослеживается гомология с энхансером гена *10* фага T7, для которо-



**Рис. 5.** Локализация участка связывания белка S1 в лидере мРНК L7/12 с помощью энзиматического футпринг-анализа. Авторадиограмма 8% ПААГ. С, U, A, G – сиквенсные дорожки, на U-дорожке точками отмечены крайние позиции фрагмента последовательности *rplL*-лидера, приведенной слева от рисунка. 1–3 – обратная транскрипция на статистическом гидролизате мРНК L7/12, полученном при обработке РНКазой T2 ( $10^{-4}$  ед. акт.) свободной мРНК (1) и в комплексе с белком S1 (2, 3). 4 – обратная транскрипция на интактной мРНК L7/12 в присутствии белка S1. [S1], мкМ: 0 (1), 0.4 (2), 0.8 (3, 4). Вертикальной линией отмечен район защиты РНК от расщепления в присутствии белка S1.

го также предполагалась возможность комплементарных взаимодействий с 16S рРНК [22]:

энхансер гена *10* фага T7: UUAACUUUA  
лидер *rplL*: (-60)UUAUCUUUUA

Таким образом, результаты, полученные в данной работе, позволяют полагать, что синтез рибосомных белков L10 и L7/12 в соотношении 1:4 может достигаться на трансляционном уровне за счет работы механизмов трансляционного усиления. Лидерная последовательность мРНК *rplL* (L7/12) способна обеспечивать независимую инициацию трансляции и содержит структурные элементы, отвечающие за эффективность этого процесса. Один из механизмов трансляционного

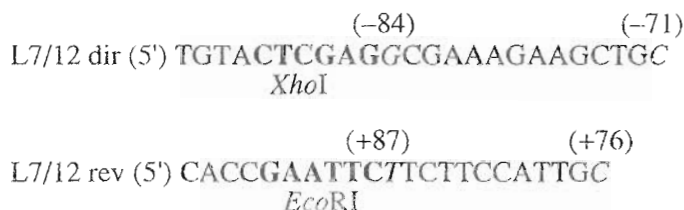
усиления предполагает участие мРНК-связывающего рибосомного белка S1 в повышении аффинности трансляционной инициаторной области к рибосоме; идентифицирован соответствующий элемент-мишень для S1. Дальнейшие исследования, как мы полагаем, позволят прояснить сложную картину регуляции белкового синтеза в *rplL*-районе. Так, очевидно, что в параллель к приведенным в данной работе экспериментам *in vivo* необходимо получить относительные характеристики активности лидера *rplI*, отвечающего за эффективность синтеза белка L10.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались следующие материалы и реагенты: эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Xho*I (Boehringer-Mannheim);

*Hinc*II, экзонуклеаза *Bal*31 (Promega); тРНК<sup>Met</sup> и суммарная тРНК *E. coli* (Sigma); [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (Обнинск); dNTP, ddNTP (Pharmacia); рибонуклеаза T2 (Sankyo); обратная транскриптаза (AMV reverse transcriptase), *Taq*-ДНК-полимераза, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (Promega); T4-полинуклеотидкиназа, T4-ДНК-лигаза (Boehringer-Mannheim); реактивы для гель-электрофореза (Biogad).

**Получение плазмидных конструкций для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.** Фрагмент ДНК, содержащий трансляционный инициаторный район гена *rplL*, был получен с помощью ПЦР на геномной ДНК *E. coli* с применением пары праймеров, в которые были включены сайты для эндонуклеаз рестрикции *Xho*I и *Eco*RI (выделены жирным шрифтом):



Цифры в скобках обозначают позицию в последовательности гена *rplL* (относительно первой буквы стартового кодона), которой соответствует отмеченный курсивом нуклеотид. ПЦР проводили на амплификаторе Hybaid OmniGene (MWG-Biotech) в следующем режиме: "горячий старт" – 3 мин, 94°C, далее 30 циклов (94°C, 30 с; 55°C, 40 с; 72°C, 30 с). После экстракции реакционной смеси хлороформом и осаждения ДНК этанолом продукт ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Xho*I и *Eco*RI и лигировали с вектором pSP73 (Promega), обработанным теми же ферментами рестрикции и дефосфорилированным. Для трансформации использовали клетки *E. coli* DH-5 $\alpha$ ; наличие вставки в плаزمиде, выделенных из трансформантов, проверяли рестриктным анализом. Полученная в результате конструкция названа pSL712, она содержит фланкированную *Xho*I- и *Eco*RI-сайтами регуляторную область *rplL* под контролем T7-промотора (см. рис. 1).

Для получения рекомбинантных штаммов *E. coli*, в которых регуляторная область *rplL* включена в хромосомный *lac*-оперон путем слияния с геном *lacZ* и управляет синтезом  $\beta$ -галактозидазы, в качестве базового вектора использовали pEMBL46, описанный в работе [14]. Для выделения вставки плазмиду pSL712 линейаризовали по *Xho*I-сайту, проводили достройку с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и затем обработку эндонуклеазой рестрикции *Eco*RV.

Соответствующий фрагмент ДНК после очистки в 8% ПААГ и электрооэлюции лигировали с вектором pEMBL46 (Amp<sup>r</sup>), расщепленным по *Hinc*II-сайту и дефосфорилированным. Для трансформации использовали штамм *E. coli* JM101; селекцию трансформантов, устойчивых к ампициллину, проводили на агаровой среде в присутствии X-gal и IPTG, что позволяло идентифицировать Lac<sup>+</sup>-колонии по синей окраске (тест на  $\alpha$ -комplementation). Последовательность вставки в отобранных плазмиде проверяли секвенированием по Сэнгеру с применением Sequenase Version 2.0, набора реагентов и протокола фирмы USB. Полученная плазмидная конструкция названа pEL712-84.

Для получения производных pEL712, содержащих перед *lacZ*-геном лидеры *rplL* с укороченной 5'-концевой последовательностью, pEL712-84 расщепляли по *Bam*HI-сайту и обрабатывали экзонуклеазой *Bal*31 в контролируемом временном режиме. Реакционную смесь, содержащую в 100 мкл 20–25 мкг линейаризованной по *Bam*HI-сайту плазмиды и 4 ед. акт. *Bal*31 в рекомендованном производителем буфере, инкубировали при 30°C и через каждые 2 мин отбирали аликвоты по 20 мкл в пробирки, содержащие 5 мкл 0.1 М раствора EGTA (этиленгликоль-бис( $\beta$ -аминоэтиловый эфир)тетрауксусная кислота, Sigma) – ингибитора *Bal*31. По окончании реакции пробы объединяли, проводили экстракцию фенолом, осаждение ДНК этанолом и далее расщепление по *Hind*III-сайту.

Фрагменты, соответствующие укороченным с 5'-конца вставкам, очищали в 8% ПААГ, объединяли и клонировали в векторе рEMBL46/*HincII*, *HindIII*, используя для трансформации клетки *E. coli* JM101, как указано выше. Далее проводили анализ плазмид, оценивая длину *BamHI-HindIII*-вставок в 8% ПААГ. В двух отобранных плазмидах, содержащих самую короткую и "среднюю" вставки, 5'-концевую последовательность соответствующих укороченных *rplL*-лидеров устанавливали секвенированием. Плазмиды названы рEL712-48 и рEL712-24.

**Эксперименты in vitro. Тоупринт-анализ.** Плазмиду рSL712 линеаризовали по *EcoRI*-сайту и мРНК синтезировали in vitro с помощью Т7-РНК-полимеразы, используя набор реагентов и протоколы фирмы Promega (Riboprobe Gemini System II). Тоупринт-анализ проводили согласно методике, опубликованной нами ранее [18, 19, 23]. Для получения тройного инициаторного комплекса в 10 мкл буфера связывания (БС: 20 мМ Трис-НСI (рН 7.6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 1 мМ дитиотреит) в присутствии 10 ед. акт. ингибитора РНКаз (Promega) инкубировали 30S рибосомные субчастицы (приготовлены В.И.Махно, ЛИЯФ РАН, Гатчина), незаряженную инициаторную тРНК и РНК-транскрипт. Условия инкубации: 10 мин, 37°C, концентрации компонентов в каждом отдельном случае указаны в подписях к рисункам. Далее проводили обратную транскрипцию с меченым праймером, в качестве которого использовали олигонуклеотид "L7/12 rev" (см. выше), меченный <sup>32</sup>P по 5'-концу в реакции кинирования. Тоупринт-анализ для выяснения роли белка S1 в образовании инициаторного комплекса проводили аналогично, но с 30S субчастицами, лишенными белка S1, в отсутствие или при добавлении свободного S1. Получение препаратов и методики описаны ранее [18, 19, 23].

Для тоупринт-анализа, в котором вместо интактного РНК-транскрипта использовался его статистический гидролизат, синтезированную in vitro РНК обрабатывали рибонуклеазой T2: 30 пмоль мРНК инкубировали 5 мин при 37°C с РНКазой T2 (10<sup>-3</sup> ед. акт./мкл смеси) в 10 мкл БС, после чего разбавляли до 50 мкл 0.3 М ацетатом Na (рН 5) и проводили двукратную экстракцию фенолом и смесью фенол/хлороформ с последующим осаждением РНК этанолом. Полученный препарат РНК использовали в тоупринт-анализе как описано выше.

**Футпринтинг.** 0.6 пмоль РНК-транскрипта (с плазмиды рSL712) инкубировали без белка S1 или при добавлении его в возрастающем количестве в 8.5 мкл БС 10 мин при 37°C, после чего в каждую пробу добавляли 3 мкг суммарной тРНК *E. coli* (в объеме 0.5 мкл) и 1 мкл раствора РНКазы T2 (10<sup>-3</sup> ед. акт) и инкубировали еще 4 мин. Гидро-

лиз останавливали добавлением 30 мкл раствора, содержащего 0.4 М ацетат Na (рН 5) и 0.2 мг/мл тРНК-носителя, после чего проводили обработку фенолом, РНК осаждали этанолом и анализировали в системе обратной транскрипции с меченым праймером.

**Эксперименты in vivo.** Для получения штаммов *E. coli*, содержащих в хромосомной *lac*-области регуляторный район *rplL*-гена или его укороченные варианты, использовали подход, описанный в работе [14]. Клетки *E. coli* HfrG6Δ12 трансформировали плазмидами рEL712 (-84, -48 и -24) и полученные колонии трансформантов с обычного агара переносили на агар McConkey (Difco), содержащий 2% лактозу. Через 2-3 сут на слое белых нерастающих клеток появлялись красные колонии рекомбинантов - клеток, которые в результате рекомбинации между плазмидной *lac*-областью и хромосомной приобрели способность усваивать лактозу, синтезируя β-галактозидазу под контролем интегрированной лидерной области *rplL* или ее укороченных производных. После удаления плазмиды в результате нескольких пассажей на среде без ампициллина, Lac<sup>+</sup> Amp<sup>r</sup>-клетки выращивали на богатой синтетической среде в присутствии 1 мМ IPTG и при достижении экспоненциальной фазы роста осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком. Активность β-галактозидазы во фракции растворимых клеточных белков измеряли по гидролизу ONPG (*o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид) на спектрофотометре Kontron UVICON 930, снабженном соответствующим программным обеспечением (см. [24]).

Авторы выражают благодарность М. Дрейфусу (M.Dreyfus, ENS, CNRS D1302, Paris) за неоценимую помощь в проведении экспериментов in vivo и предоставлении базовых штаммов *E. coli* и рEMBL46; В.И.Махно за препараты 30S рибосомных субчастиц, Н.В.Скапцовой за синтез олигонуклеотидных праймеров. Работа финансировалась грантами ГНТП ("Новейшие методы биоинженерии"), РФФИ (97-04-48834), а также грантом CNRS (France) для И.В. Бони.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Post L.E., Strycharz G.D., Nomura M., Lewis H., Dennis P.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 1697-1701.
2. Nomura M., Gourse R., Baughman G. // Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 75-117.
3. Barry G., Squires C., Squires C.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 3331-3335.
4. Barry G., Squires C., Squires C.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4922-4926.
5. Downing W.L., Dennis P.P. // J. Mol. Biol. 1987. V. 194. P. 609-620.



6. Johnsen M., Christensen T., Dennis P.P., Fül N.P. // EMBO J. 1982. V. 1. P. 999–1004.
7. Petersen C. // J. Mol. Biol. 1989. V. 206. P. 323–332.
8. Zengel J.M., Lindahl L. // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1994. V. 47. P. 331–370.
9. Petersen C. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 431–436.
10. McCarthy J.E.G., Schairer H.U., Sebald W. // EMBO J. 1985. V. 4. P. 519–526.
11. Hartz D., McPheeters D.S., Traut P., Gold L. // Methods Enzymol. 1988. V. 164. P. 419–425.
12. Hartz D., McPheeters D.S., Gold L. // J. Mol. Biol. 1991. V. 218. P. 83–97.
13. de Smit M.H., van Duin J. // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1990. V. 38. P. 1–35.
14. Dreyfus M. // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. P. 79–94.
15. Horiuchi T., Tomizawa J., Novick A. // Biochim. Biophys. Acta. 1962. V. 55. P. 152–163.
16. Firpo M.A., Dahlberg A.E. // Post-transcriptional Control of Gene Expression, V. H49 / Eds J.E.G. McCarthy, M.F. Tuite. B.: Springer-Verlag, 1990. P. 185–195.
17. Schauder B., McCarthy J.E.G. // Gene. 1989. V. 78. P. 59–72.
18. Boni I.V., Isaeva D.M., Musychenko M.L., Tsareva N.V. // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 155–162.
19. Tsareva N.V., Makhno V.I., Boni I.V. // FEBS Lett. 1994. V. 337. P. 189–194.
20. Ringquist S., Jones T., Snyder E., Gibson T., Boni I., Gold L. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 3640–3648.
21. Thanaraj T.A., Pandit M.W. // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 2973–2985.
22. Olins P.O., Rangwala S.H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 16973–16976.
23. Царева Н.В., Музыченко М.Л., Бони И.В. // Биоорг. химия. 1993. Т. 19. С. 968–977.
24. Yarchuk O., Jacques N., Guillerez J., Dreyfus M. // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 581–596.

## Regulation of the Ribosomal L7/12 Protein Synthesis: The Role of the Intercistronic *rplJL* Region as a Translational Enhancer

V. S. Artamonova, N. V. Tsareva, and I. V. Boni<sup>#</sup>

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

The ability of the *Escherichia coli* intercistronic *rplJL* region to initiate effectively the synthesis of the ribosomal protein L7/12, the only ribosomal component present in the ribosome in four copies rather than in one was studied *in vivo* and *in vitro*. It was shown that the structural determinants located upstream from the Shine–Dalgarno sequence and sharing structural motifs with the known *E. coli* translational enhancers are necessary for high activity of this region in translation initiation. These data indicate that mRNA–protein interactions through the ribosomal S1 protein play an important role in the formation of the initiation complex, and an enhancer region within the leader of the L7/12 mRNA serves as a target for this protein.

*Key words: rplL mRNA, translation initiation, translational enhancers*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: irina@humgen.siobc.ras.ru.