



УДК 577.217.35

ИЗБЫТОЧНАЯ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ ОБЛАСТИ ШАЙНА–ДАЛЬГАРНО И 3'-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА 16S РИБОСОМНОЙ РНК НЕЭФФЕКТИВНА ПРИ ТРАНСЛЯЦИИ *in vivo*

© 2001 г. А. В. Комарова[#], Л. С. Чуфистова, Е. В. Супина, И. В. Бони

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117977 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 27.11.2000 г. Принята к печати 14.02.2001 г.

Инициация трансляции у *Escherichia coli* включает, как правило, комплементарные взаимодействия между последовательностью Шайна–Дальгарно (SD), предшествующей инициаторному кодону, и высококонсервативной последовательностью на 3'-конце 16S рРНК (анти-SD). Считается, что аффинность рибосом к инициаторному участку мРНК прямо влияет на эффективность трансляции. Ранее методом SELEX были отобраны РНК-лиганды с высокой аффинностью к рибосомам, причем представительная группа лигандов содержала протяженную SD-последовательность. В данной работе исследована способность искусственного рибосомсвязывающего участка, содержащего такую протяженную (10-звенную) SD-последовательность (супер-SD), направлять трансляцию в *E. coli in vivo*, а также его способность к формированию инициаторного комплекса *in vitro*. Методом туп-принт-анализа показано образование тройного инициаторного комплекса на мРНК, содержащей супер-SD, и, кроме того, получено доказательство образования SD-дуплекса в бинарном комплексе 30S рибосомной субчастицы и мРНК. В то же время в трансляции *in vivo* супер-SD-элемент показал низкую активность. Мы предполагаем, что инициаторный комплекс, образованный с участием супер-SD-элемента, оказывается слишком стабильным и тормозит переход от стадии инициации к стадии элонгации, что может нарушать сопряжение транскрипции и трансляции, и ингибировать процесс образования полисом.

Ключевые слова: последовательность Шайна–Дальгарно (SD); инициация трансляции.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность белкового синтеза у прокариот во многом зависит от эффективности инициации трансляции [1–3]. Считается, что чем эффективнее связывается рибосома с мРНК, то есть чем выше аффинность инициаторной области мРНК к рибосоме, тем выше уровень белкового синтеза [1]. Связывание 30S субчастиц рибосом (отвечающих за инициацию) с инициаторной областью мРНК направляется специфическими сигналами, отмечающими стартовую точку трансляции. Одним из наиболее изученных элементов рибосомсвязывающих участков (RBS) прокариотических мРНК, дающих весомый вклад в эффективность связывания с рибосомой, является последовательность Шайна–Дальгарно (SD) – предшествующий стартовому кодону пуринобогатый

участок, для которого получены прямые доказательства участия в формировании инициаторного трансляционного комплекса за счет образования комплементарного дуплекса с 3'-концевой областью 16S рРНК AUCACCUCUUA(3') [4–6]. Большинство мРНК *E. coli* содержит SD-элемент, длина которого варьирует от 3 до 7 нт, при этом чаще всего встречаются SD-элементы из 4–5 нт, комплементарных CCUCCU-последовательности 16S рРНК [7].

Хотя многими авторами выделяется центральная роль SD-взаимодействий в обеспечении достаточной аффинности мРНК к рибосоме [4–6], вклад степени комплементарности мРНК–16S РНК в эффективность трансляции оценивается неоднозначно. По результатам работы [8], усиление SD-взаимодействий (от 4 до 8 и 13 потенциальных комплементарных пар в дуплексе) привело не к повышению, а к последовательному снижению уровня белкового синтеза. В то же время при очень похожем подходе в работе [9] удлинение SD-дуплекса от 4 до 7 п. о. усилило трансляцию в системе *in vitro* с рибосомами *E. coli* (в 7 раз), хотя дальнейшее увеличение степени комплементар-

Сокращения: SD – последовательность Шайна–Дальгарно; RBS – рибосомсвязывающий участок; ONPG – *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид; IPTG – изопропил-β-D-галактопиранозид; X-Gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-65-47; факс: (095) 330-65-38; e-mail: stasy@humgen.siobc.ras.ru).

ности до 12 п. о. в дуплексе приводило к снижению синтеза, как и в работе [8]. В работе [10] с помощью сайт-направленного мутагенеза варьировали как протяженность SD-элемента (GGAG, GGA, GGUG, GGAGGU), так и энергетические параметры локальной вторичной структуры в RBS гена белка оболочки бактериофага MS2. Этот RBS представляет собой простую шпильчатую структуру с инициаторным кодоном AUG на вершине и SD-последовательностью в стебле. Было показано, что уменьшение протяженности SD-элемента приводит к снижению эффективности трансляции *in vivo* только в том случае, если эта шпильчатая структура стабильна, а при низкой стабильности локальной структуры ослабление SD-взаимодействий не влияло на эффективность трансляции. С другой стороны, в работе [11] были получены плазмидные конструкции, в которых синтез β -галактозидазы направлялся RBS с SD-элементами разной длины, причем эти RBS не содержали стабильных вторичных структур. Тем не менее укорачивание SD-последовательности от 8 до 5 нт снижало эффективность трансляции в системе *in vivo* приблизительно в 4 раза. Таким образом, данные о наличии корреляции между протяженностью SD-дуплекса и эффективностью трансляции весьма противоречивы.

Ранее для поиска оптимального рибосомсвязывающего участка был применен метод SELEX [12], с помощью которого были отобраны РНК-лиганды, связываемые рибосомами *E. coli* с высокой аффинностью (K_d 4–7 нМ). Данный подход показал, что рибосома способна отбирать высокоаффинные лиганды двух типов: малоструктурированную РНК, содержащую протяженную SD-последовательность в одностеблевом участке (10–11 нт), и не содержащую выраженного SD-элемента РНК, формирующую структуру типа псевдоузла. Несмотря на высокую аффинность к интактной 30S рибосомной субчастице, эффективность таких РНК-лигандов в трансляции *in vivo* далеко не очевидна, как не очевидно и то, существует ли прямая корреляция между прочностью бинарного комплекса рибосома–матрица и уровнем белкового синтеза.

Цель данной работы – оценка эффективности протяженного SD-элемента (названного супер-SD), отобранного по методике SELEX в качестве высокоаффинного РНК-лиганда для 30S рибосомной субчастицы *E. coli*, в инициации трансляции *in vivo* и *in vitro*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения эффективности протяженного SD-элемента в инициации трансляции *in vivo* был использован подход, ранее разработанный для сравнительного изучения активности различных рибосомсвязывающих участков и подробно описанный в работах [13–15]. На основе вектора

pEMBL Δ 46 [13] нами была создана плазмидная конструкция, в которой синтез α -пептида β -галактозидазы управляется на транскрипционном уровне промотором и оператором *lac*-оперона, а на трансляционном – искусственным RBS, содержащим протяженный SD-элемент и соединенным с кодирующей частью *lacZ*-гена с сохранением рамки считывания (рис. 1). При планировании последовательности искусственного RBS учитывались данные метода SELEX по структуре SD-содержащего РНК-лиганда [12], данные по оптимальному нуклеотидному составу и длине участка, разделяющего SD-элемент и инициаторный кодон [8, 11, 16], а также информация о частоте встречаемости второго кодона [1]. Путем отжига химически синтезированных олигонуклеотидов (*sd1* и *sd2*, см. “Эксперимент. часть”) был получен фрагмент двухцепочечной ДНК, готовый к клонированию в плазмидный вектор pEMBL Δ 46 по участкам *Bam*HI и *Hind*III, для чего были предусмотрены 5'-выступающие концы. В плазмиде pEMBL Δ 46 делетирован RBS гена *lacZ* и введен ряд рестриктных сайтов, в том числе для эндонуклеаз *Bam*HI и *Hind*III [13].

В результате клонирования синтетического фрагмента ДНК в вектор pEMBL Δ 46/*Bam*HI-*Hind*III была получена желаемая плазмидная конструкция pEMBL-SD1/2, в которой синтез α -пептида β -галактозидазы направляется RBS, содержащим супер-SD (рис. 1). Далее эта плаزمида использовалась для трансформации штамма HfrG6 Δ 12(*Lac*⁻) *E. coli*, в котором область инициации трансляции хромосомного гена *lacZ* делетирована [13]. В содержащих плазмиду клетках по механизму гомологичной рекомбинации между плазмидной и хромосомной *lac*-областями искусственный RBS с супер-SD-последовательностью из плазмиды встраивался в хромосому и направлял синтез β -галактозидазы, что приводило к фенотипу *Lac*⁺. Полученный рекомбинантный штамм (назван IBCENS-SD1/2) был охарактеризован по эффективности синтеза β -галактозидазы (таблица). Для сравнения в таблице приведены данные по β -галактозидазной активности для аналогичных рекомбинантных штаммов, сконструированных с помощью такого же подхода и содержащих различные природные рибосомсвязывающие участки, управляющие синтезом β -галактозидазы с хромосомного *lacZ*-гена [15, 17].

Измерения β -галактозидазной активности показали, что в сравнении с природными RBS супер-SD-последовательность обладает низкой эффективностью в трансляции *in vivo* (таблица). Из таблицы видно, что в природных RBS SD-последовательность представлена 3–5 нт, комплементарными 3'-концу 16S рРНК, но даже такие непротяженные SD-элементы обеспечивают намного более эффективный синтез белка, чем супер-SD.

Низкий уровень белкового синтеза, направляемого RBS с протяженным SD-элементом, теоре-

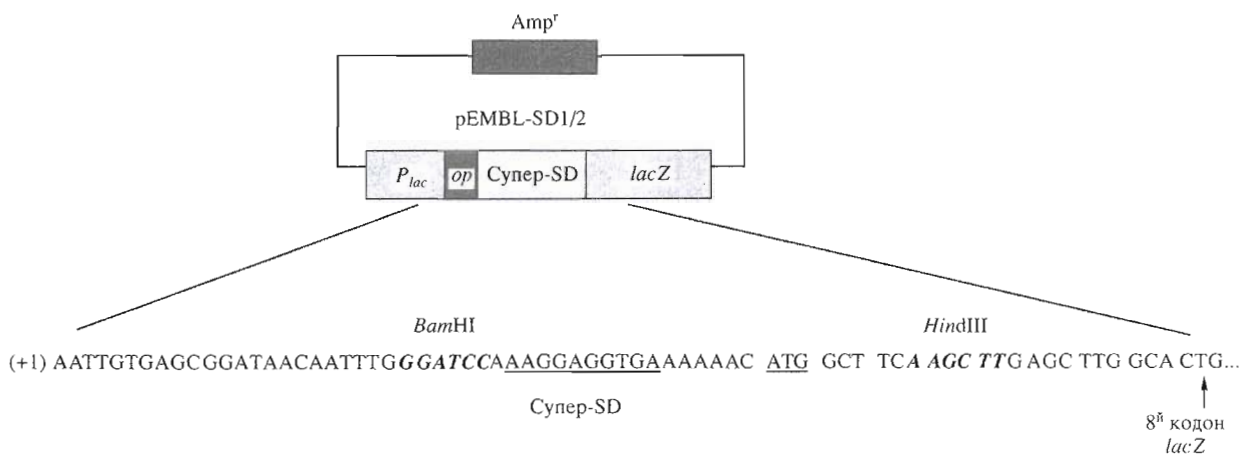


Рис. 1. Схема строения плазмиды pEMBL-SD1/2. P_{lac} и op – промотор и оператор lac-оперона соответственно. Показана последовательность, соответствующая 5'-концевой области химерной lacZ-мРНК, начиная со стартовой точки транскрипции (+1). Указано положение участков узнавания BamHI и HindIII (жирный шрифт, курсив); супер-SD-элемент и инициаторный кодон подчеркнуты; разбивка на триплеты отвечает трансляционной рамке lacZ-гена.

тически может объясняться рядом причин. Так, например, показано, что если SD-элемент вовлечен в стабильную вторичную структуру и не доступен для взаимодействия с рибосомой, то эффективность образования инициаторного комплекса и, как следствие, трансляции в целом, низка [18]. Проведенный с помощью доступной в Интернете программы RNAfold [19] анализ вероятной вторичной структуры 5'-концевой области мРНК, синтезируемой в полученном рекомбинантном штамме с lac-промотора и направляющей синтез β-галактозидазы *in vivo*, показал (рис. 2а), что, как и в супер-SD-содержащем РНК-лиганде, полученном по методу SELEX [12], SD-последовательность не вовлечена в стабильную структуру и должна быть доступна для связывания с рибосомой. Более того, связывание 30S субчастицы с таким RBS является энергетически предпочтительным, так как свободная энергия образования

SD-дуплекса составляет -15.7 ккал/моль, тогда как стабильность всей локальной вторичной структуры в районе инициаторного кодона оценивается в -13.8 ккал/моль (здесь и далее оценка ΔG_f^0 дана для 37°C). Таким образом, теоретических препятствий к связыванию рибосомы с рассматриваемой нами структурой нет (рис. 2а).

Другой возможной причиной низкого уровня белкового синтеза, направляемого протяженным SD-элементом, может быть образование стабильного, но непродуктивного комплекса рибосома-мРНК, когда даже при наличии SD-дуплекса инициаторный кодон мРНК не попадает в рибосомный Р-участок и не взаимодействует с антикодоном инициаторной тРНК. Такую возможность нельзя игнорировать, так как связывание рибосом с протяженной SD-последовательностью в отсутствие инициаторного кодона было недавно прямо доказано в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [20]. В качестве теста на образование истинного инициаторного комплекса *in vitro* мы использовали метод тоупринтинга (toeprinting) [21].

В основе метода тоупринтинга лежит многократно проверенный факт, что связанная с мРНК рибосома в присутствии инициаторной тРНК, взаимодействующей с инициаторным кодоном матрицы, служит препятствием для обратной транскриптазы в реакции удлинения праймера, комплементарного участку в кодирующей области мРНК. В тройном инициаторном комплексе рибосома останавливает синтез кДНК в строго определенном месте, соответствующем позиции +16, если позицию А в AUG-кодоне мРНК принимать за +1. Для тоупринтинга используют меченый праймер, и меченые продукты транскрипции анализируют в денатурирующем ПААГ, определяя положения стоп-сигналов относительно результатов

Активность β-галактозидазы в производных штамма *E. coli* HfrG6, содержащих различные RBS перед геном lacZ

RBS	β-галактозидазная активность*	SD-последовательность
SD1/2	350 ± 50	AAGGAGGUGA
lacZ	5600 ± 200	AGGA
rplL	9500 ± 1500	AGGA
rpsA	18000 ± 1000	AAG
galE	10000 ± 1000	GGAG
thrA	2000 ± 400	GAGGU

* Активность β-галактозидазы во фракции растворимых клеточных белков выражена в нмоль ONPG, гидролизированного за 1 мин 1 мг суммарного растворимого клеточного белка (нмоль ONPG/мин/мг белка). Данные для RBS генов rplL, rpsA, galE и thrA взяты из работы [15], lacZ – из работы [17].

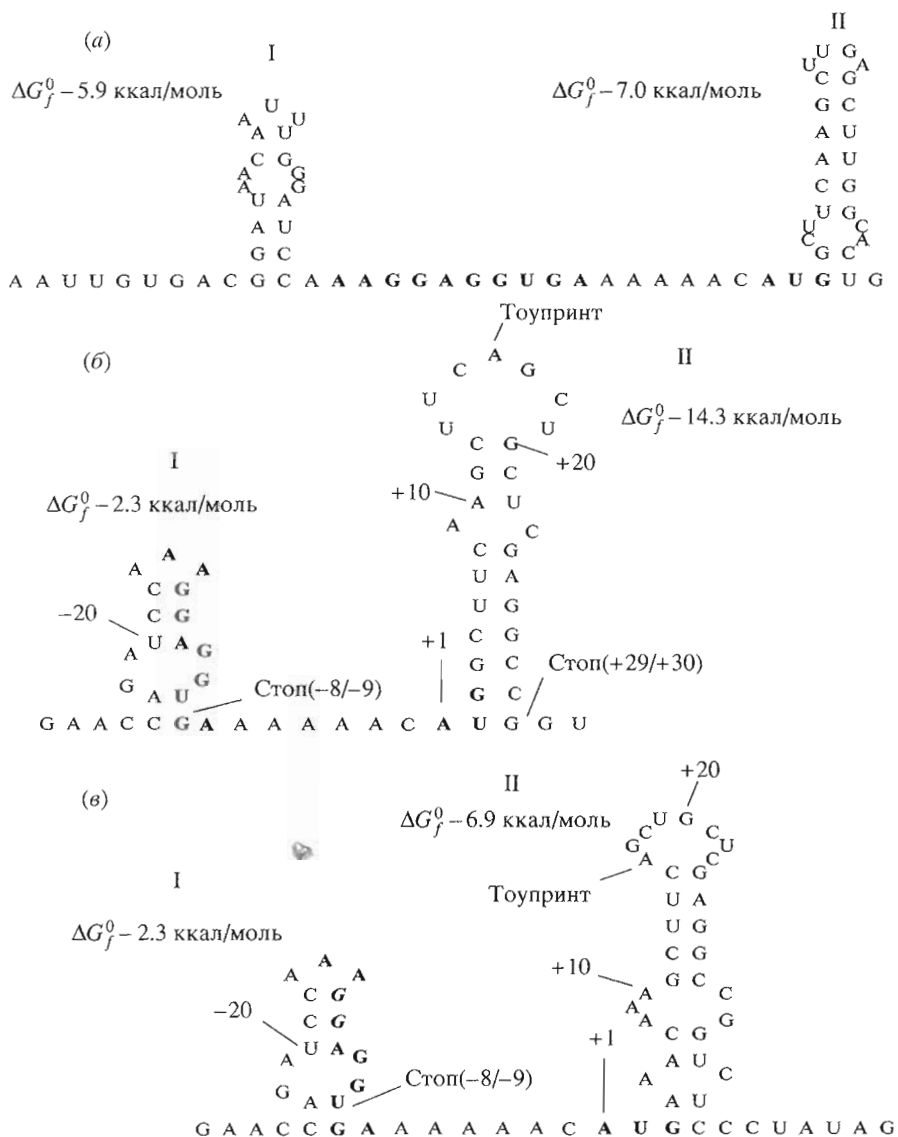


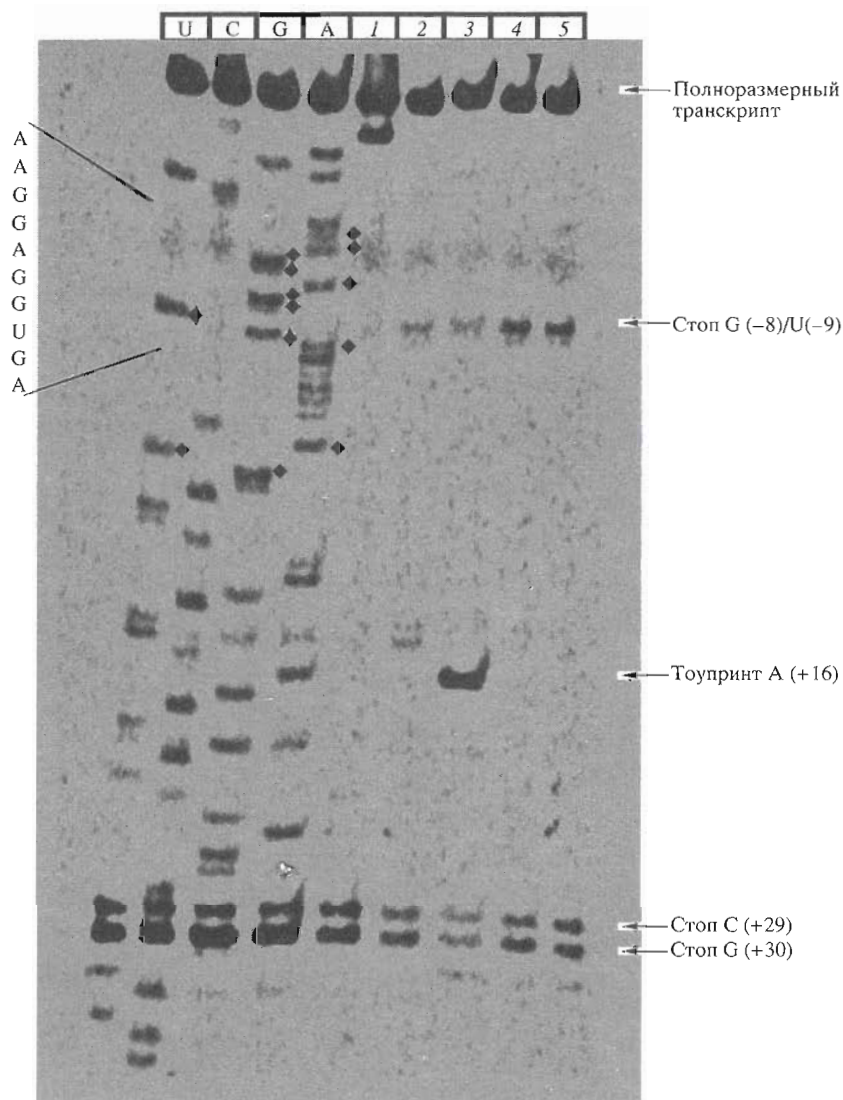
Рис. 2. Вторичная структура 5'-концевых областей мРНК в экспериментах *in vivo* (а) и *in vitro* (б и в). а, б – мРНК содержит искусственный RBS SD1/2, в – SD3/4. SD-последовательность и инициаторный кодон выделены жирным шрифтом. Указаны свободные энергии образования локальных вторичных структур (шпильки I и II), рассчитанные по программе RNAfold [19]. Стрелками отмечены положения стоп-сигналов в тоупринт-анализе (см. текст).

РНК-секвенирования, полученных методом удлинения того же праймера по Сэнгеру и представленных на том же ПААГ [14, 21].

Для того чтобы получить мРНК для тоупринт-экспериментов, была создана плазмидная конструкция для синтеза РНК *in vitro*. Синтетический дуплекс (искусственный RBS, содержащий супер-SD и использованный для получения рекомбинантов в экспериментах *in vivo*) был клонирован в векторе рSP73 по участкам *Bgl*III и *Hind*III под контроль SP6-промотора. В результате была получена плазида рSP-SD1/2, содержащая тот же искусственный RBS, что и в экспериментах *in vivo*, но в другом нуклеотидном контексте. Плазмиду линеаризовали эндонуклеазой *Dra*I и с помощью

транскрипции *in vitro* получали РНК, которую использовали для тоупринт-анализа.

Тоупринт-анализ проводили для двух препаратов 30S субчастиц – содержащих и не содержащих рибосомный белок S1 (рис. 3). Мы хотели убедиться в достоверности ранее высказанных предположений, что этот мРНК-связывающий белок не обязателен для инициации трансляции на мРНК, содержащих протяженную SD-последовательность [22]. Тоупринт-анализ с интактной 30S рибосомной субчастицей (рис. 3, дорожка 3) показал наличие на авторадиограммах нескольких стоп-сигналов, соответствующих местам остановки обратной транскрипции. Результаты секвенирования РНК, представленные на этой же авторади-



Во всех пробах [мРНК] 0.08 мкМ

Дорожка	[30S], мкМ	[30S-S1], мкМ	[тРНК _f ^{Met}], мкМ
1	–	–	–
2	0.4	–	–
3	0.4	–	4
4	–	0.4	–
5	–	0.4	4

Рис. 3. Образование 30S инициаторного комплекса (тоупринт-анализ) на РНК, синтезированной *in vitro* с плазмиды рSP-SD1/2/*Dra*I. Авторадиограмма 6% денатурирующего ПААГ. U, C, G, A – сиквенные дорожки, на дорожках отмечено положение инициаторного кодона и SD-последовательности (ромбами). Стоп-сигналы указаны стрелками. Дорожки 1–5 – обратная транскрипция в присутствии компонентов инициаторного комплекса, концентрации которых указаны в таблице к рисунку. Слева от авторадиограммы приведена нуклеотидная последовательность супер-SD.

ограмме, позволяют локализовать места остановки обратной транскриптазы в последовательности РНК (рис. 3). Механизмы образования стоп-сигналов в тоупринт-анализе схематически пред-

ставлены на рис. 4а–4г, где схема а иллюстрирует образование полноразмерного транскрипта.

Стоп-сигналы, соответствующие нуклеотидам С(+29) и G(+30), видны как в сиквенных дорож-

ках, так и в дорожках тоупринт-анализа (рис. 3). Наиболее вероятно, что синтез кДНК тормозится в позициях +29, +30 кодирующей области из-за существования в этом районе устойчивой вторичной структуры (рис. 4б). Хотя обратная транскриптаза AMV, используемая в тоупринтинге, и обладает способностью плавить шпильчатые структуры на РНК, но в случае их повышенной стабильности, по наблюдениям многих авторов, часто происходит обрыв синтеза кДНК [23]. Компьютерный анализ показал, что позиции +29, +30 соответствуют 3'-границе стебля очень стабильной шпильчатой структуры (рис. 2б, шпилька II, ΔG_f^0 –14.3 ккал/моль [19, 24]), что подтвердило наши предположения.

Сигнал, соответствующий нуклеотиду А(+16) в дорожке 3, является классическим тоупринт-сигналом (рис. 3), который образуется только в присутствии инициаторной тРНК [1, 21, 23]. Отсутствие этого сигнала в дорожке 2, т.е. в отсутствие инициаторной тРНК, позволяет с уверенностью сказать, что полученная мРНК способна к формированию истинного 30S инициаторного (продуктивного) комплекса, в котором инициаторная тРНК связана кодон-антикодоновыми взаимодействиями с AUG-кодоном (рис. 4в). Именно в этой пробе ослаблены сигналы (+29) и (+30), вызванные шпильчатой структурой II (см. выше). Такое соотношение интенсивностей свидетельствует о том, что рибосома в присутствии инициаторной тРНК обладает способностью плавить вторичную структуру мРНК в районе инициаторного кодона, то есть разрушать внутримолекулярные связи в молекуле мРНК, препятствующие образованию продуктивного инициаторного комплекса. Эти данные хорошо соотносятся с результатами работы [25], где методом футпринт-анализа было показано, что добавление инициаторной тРНК к бинарному комплексу 30S субчастица–мРНК приводит к расплавлению вторичной структуры мРНК в районе RBS. В связи с этим особый интерес вызывает отсутствие классического тоупринт-сигнала (+16) в пробе, где для тоупринтинга использовались 30S субчастицы, лишённые белка S1 (рис. 3, дорожка 5). Эти результаты позволяют предположить, что белок S1, возможно, отвечает за подобную плавящую способность рибосомы.

Надо заметить, что в работе [22], в которой методом тоупринтинга изучали образование тройного инициаторного комплекса на мРНК с протяжённой SD-последовательностью (9 нт), была показана возможность образования такого комплекса и в отсутствие белка S1. Противоречие этих данных с нашими может, вероятно, объясняться тем, что в цитируемой работе [22] использовалась мРНК, не образующая стабильной вторичной структуры с участием AUG-кодона.

Стоп-сигнал, соответствующий нуклеотиду G(–8) (или U(–9)), разрешение не позволяет более

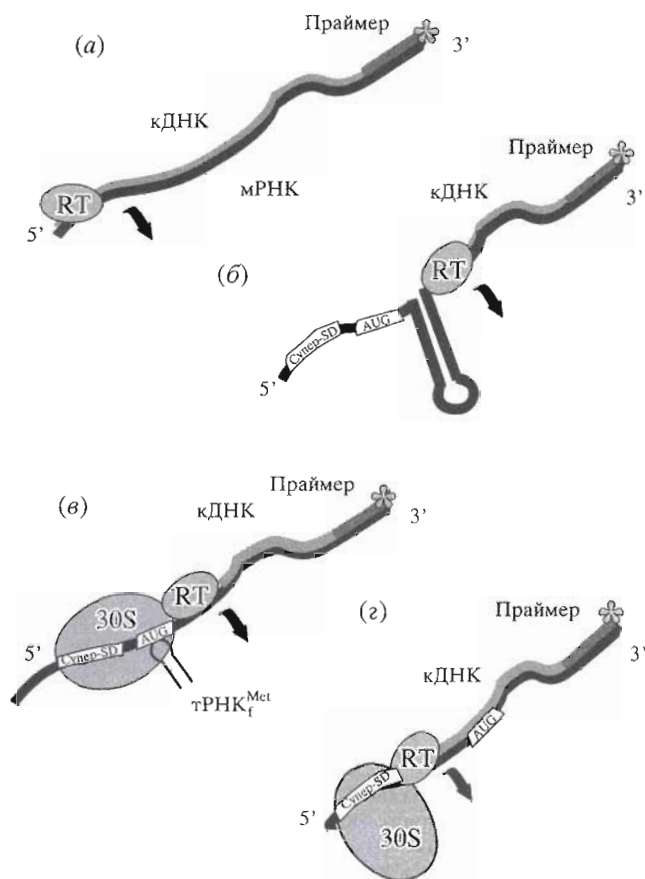


Рис. 4. Пути образования стоп-сигналов в тоупринт-анализе (рис. 3): а – образование полноразмерного транскрипта; б – остановка обратной транскрипции на 3'-границе стабильной шпильчатой структуры; в – образование классического тоупринт-сигнала в позиции (+16); з – остановка обратной транскрипции на границе протяжённого SD-дуплекса. RT – обратная транскриптаза.

точную локализацию), с разной интенсивностью присутствует во всех 4-х дорожках, где в пробах содержится 30S субчастица, и не зависит от наличия тРНК и белка S1 (рис. 3). Данный сигнал отсутствует в контрольной пробе 1, и это позволяет заключить, что его появление не связано с остановкой обратной транскрипции в месте локальной внутримолекулярной шпильчатой структуры, как в случае сигналов (+29), (+30). Кроме того, исходя из термодинамических расчетов возможной вторичной структуры [19, 24] в этом участке (рис. 2б), свободная энергия образования шпильки I составляет –2.3 ккал/моль, что несопоставимо с величиной свободной энергии образования шпильки II, а также образования протяжённого SD-дуплекса (–15.7 ккал/моль). С наибольшей вероятностью сигнал (–8/–9) вызван образованием комплементарного дуплекса между анти-SD-последовательностью 16S рРНК и SD-элементом матрицы (рис. 4z). В пробах 4 и 5 (рис. 3) он обла-

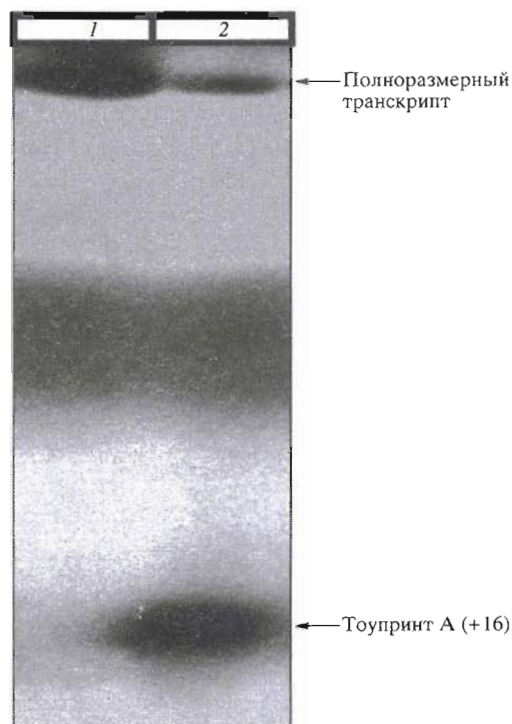


Рис. 5. Образование 30S инициаторного комплекса на РНК, синтезированной *in vitro* с плазмиды рSP-SD3/4DraI (тоупринт-анализ). Авторадиограмма 6% денатурирующего ПААГ. Положения тоупринт-сигнала и полноразмерного транскрипта указаны стрелками. Дорожка 1 – образование полноразмерного транскрипта в отсутствие компонентов инициаторного комплекса; дорожка 2 – обратная транскрипция в присутствии 0.4 мкМ 30S субчастиц и 4 мкМ тРНК_f^{Met}. Концентрация РНК-транскрипта 0.08 мкМ.

дает максимальной интенсивностью, и это означает, что 30S субчастица, лишенная белка S1, способна связывать SD-последовательность, но лишена способности к образованию истинного инициаторного комплекса. Этот результат хорошо соотносится с данными, полученными методом SELEX [12], где супер-SD-последовательность отбиралась рибосомами, лишенными белка S1. Необходимо отметить, что аналогичный сигнал уже был описан ранее в работах по тоупринт-анализу бинарных комплексов с природными матрицами, однако его детекция была возможна только при пониженной температуре реакции обратной транскрипции, либо при снижении концентрации обратной транскриптазы [23]. В нашем же случае температура (37°C) и концентрация фермента были стандартными [21].

Таким образом, в присутствии полноценной 30S рибосомной субчастицы (S1-содержащей, как и в природе) и инициаторной тРНК даже в случае сильноструктурированной в районе AUG-кодона матрицы (рис. 2б) образуется истинный 30S инициаторный комплекс. В случае супер-SD-содер-

жащей мРНК в экспериментах *in vivo* (рис. 2а) вторичная структура в области AUG-кодона гораздо менее стабильна (-7.0 ккал/моль), чем в РНК, использованной *in vitro* (-14.3 ккал/моль, рис. 2б). Это позволяет предполагать, что эффективность образования истинного тройного инициаторного комплекса *in vivo* может быть даже выше, чем *in vitro*.

Для проверки этого предположения нами была создана новая плазмидная конструкция рSP-SD3/4, содержащая RBS, аналогичный SD1/2, но с измененной последовательностью после инициаторного кодона. В результате внесенных изменений величина свободной энергии образования вторичной структуры в районе инициаторного кодона соответствующей мРНК (-6.9 ккал/моль) (рис. 2в) оказалась сопоставимой с величиной свободной энергии образования шпильки в том же районе мРНК в эксперименте *in vivo* (рис. 2а). Соотношение интенсивностей сигналов тоупринт/полноразмерный транскрипт в тоупринт-анализе показывает (рис. 5), что образование тройного инициаторного комплекса *in vitro* на такой мРНК происходит с более высокой эффективностью, чем в случае конструкции рSP-SD1/2. Тем не менее, как это уже обсуждалось выше, эффективность синтеза β-галактозидазы, направляемого *in vivo* супер-SD-последовательностью в составе RBS с аналогичными энергетическими параметрами была низкой (см. таблицу).

Таким образом, низкая эффективность супер-SD в трансляции *in vivo* не может быть объяснена такими причинами, как вовлеченность SD-последовательности в стабильную вторичную структуру или ингибирование образования истинного инициаторного комплекса. Наиболее вероятным представляется объяснение этого феномена с точки зрения термодинамики и кинетики процесса трансляции. Мы предполагаем, что образованный с участием 10-звенного SD-элемента инициаторный комплекс оказывается слишком стабильным, чтобы быть биологически активным, и представляет собой кинетически замороженный комплекс. Ранее в работе [12] было показано, что рибосома и содержащая супер-SD-элемент РНК образуют очень прочный комплекс (K_d 7 нМ). В процессе трансляции на определенной стадии элонгации этот комплекс должен быть разрушен, так как рибосома должна освободить RBS для связывания следующей рибосомы. По теоретическим оценкам, время полужизни десятичленного РНК-дуплекса при 37°C составляет не менее 30 мин (см. [26]). Можно предположить, что РНК-лиганды, обладающие высокой аффинностью к рибосомам за счет образования протяженных комплементарных мРНК-16S рРНК дуплексов, не используются клеткой для эффективного белкового синтеза, так как рибосома в таком комплексе “заморожена” в инициаторном состоянии. Такая ситуация теоретически может вызывать на-

рушение сопряжения транскрипции и трансляции, торможение процесса образования полисом и, как следствие, низкий выход белкового продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Hind*III, *Bgl*II, *Dra*I, а также ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа фага T4, IPTG и X-Gal (Boehringer-Mannheim), обратная транскриптаза AMV, вектор pSP73 и реактивы для синтеза РНК *in vitro* Riboprobe Gemini System II

(Promega), суммарная тРНК *E. coli* и тРНК_f^{Met} *E. coli* (Sigma), [γ^{32} -P]АТФ (Обнинск, Россия), ONPG (Serva), реактивы для гель-электрофореза (Biorad). Штамм *E. coli* ENS0 (HfrG6Δ12) и вектор pEMBLΔ46 предоставлены М. Дрейфусом.

Получение плазмидных конструкций для экспериментов *in vivo* и *in vitro*. Химически синтезированные дезоксиолигонуклеотиды sd1, sd2, sd3 и sd4 были использованы для получения дуплексов SD1/2 и SD3/4, готовых для клонирования по сайтам *Bam*HI (*Bgl*II) и *Hind*III:

sd1: (5')GATCCAAAGGAGGTGAAAAACATGGCTTCA

sd2: (5')AGCTTGAAGCCATGTTTTTTCACCTCCTTTG

sd3: (5')GATCCAAAGGAGGTGAAAAACATGAAACAA

sd4: (5')AGCTTTGTTTCATGTTTTTTCACCTCCTTTG

Отжиг олигонуклеотидов: эквимольные количества sd1 и sd2 (или sd3 и sd4) инкубировали в 10 мкл буфера для отжига (50 мМ Трис-НСl, рН 8.2; 60 мМ КСl; 10 мМ дитиотреит) при плавном снижении температуры от 75 до 37°C. Полученный дуплекс SD1/2 лигировали с плазмидой pEMBLΔ46 (для экспериментов *in vivo*), расщепленной по *Bam*HI- и *Hind*III-сайтам, и плазмидой pSP73 (для экспериментов *in vitro*), расщепленной по *Bgl*II- и *Hind*III-сайтам. Дуплекс SD3/4 использовался только для клонирования в pSP73/*Bgl*II–*Hind*III для экспериментов *in vitro*.

Для трансформации использовали штамм *E. coli* XL-1 blue (Stratagen). В случае лигирования дуплекса SD1/2 с вектором pEMBLΔ46/*Bam*HI–*Hind*III трансформанты отбирались на агаровой среде, содержащей ампициллин, X-Gal и IPTG, по тесту на α-комплементацию, т.е. отбирали синие колонии, содержащие плазмиды с активной в синтезе α-пептида β-галактозидазы регуляторной областью. В случае pSP73 наличие вставки в трансформантах проверяли рестриктивным анализом. Полученные плазмидные конструкции названы pEMBL-SD1/2, pSP-SD1/2 и pSP-SD3/4.

Эксперименты *in vivo*. Для получения хромосомной конструкции, в которой синтез β-галактозидазы с хромосомного *lacZ*-гена направляется супер-SD-последовательностью, использовали подход, описанный в работах [13, 15, 17]. Клетки *E. coli* HfrG6Δ12 (*Lac*[−]) трансформировали плазмидой pEMBL-SD1/2, и полученные колонии трансформантов с обычного агара переносили на агар МакКонки, содержащий 1% лактозу. Через 2–3 сут на слое белых нерастущих клеток появлялись красные колонии *Lac*⁺-рекомбинантов. Отобранные рекомбинантные клетки освобождались от плазмиды с помощью нескольких пассажей на среде без ампициллина. Полученные в результате *Lac*⁺Ampr^s-клетки (штамм назван IBCENS-SD1/2)

выращивали на богатой синтетической среде в присутствии 1 мМ IPTG до середины экспоненциальной фазы, осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком, как описано в работах [15, 17]. Активность β-галактозидазы во фракции растворимых клеточных белков измеряли по гидролизу ONPG (420 нм), используя спектрофотометр Kontron UVICON 930, снабженный соответствующим программным обеспечением (см. [15, 17]).

Теоретическая оценка вторичной структуры мРНК. Вероятность образования вторичной структуры мРНК в районе RBS оценивали с помощью программы mfold [19]. Энергетические параметры простых шпильчатых структур оценивались также с помощью программы mfold для соответствующих участков мРНК. Для расчета энергии образования SD-дуплекса использованы правила из работы [24].

Эксперименты *in vitro*. Тоупринт-анализ. Плазмиды pSP-SD1/2 и pSP-SD3/4 обрабатывали *Dra*I (ближайший к SP6-промотору *Dra*I-сайт находится на расстоянии 1076 п. о. от старта транскрипции) и использовали в качестве матриц в реакции транскрипции с SP6-РНК-полимеразой согласно протоколам и с набором реагентов фирмы Promega (Riboprobe Gemini System II). Полученные в результате РНК-транскрипты (1076 нт) использовались для тоупринт-анализа, который проводили согласно опубликованному ранее методикам [14, 21]. Каждая проба в 10 мкл буфера для связывания (10 мМ Трис-НСl, рН 7.6; 10 мМ MgCl₂; 100 мМ NH₄Cl; 1 мМ дитиотреит) содержала РНК-транскрипт с отожженным 5'-меченым праймером, ингибитор рибонуклеаз в количестве 10 ед. акт. и (если указано) 30S рибосомные субчастицы и инициаторную тРНК (неаминоацилированную). Получение препаратов 30S субчастиц описано ранее [27]. В качестве праймера использовался олигонуклеотид (5')GCCGATTCATTAATGCAG, компле-

ментарный области (+86)–(+103) РНК-транскрипта (А в инициаторном кодоне AUG соответствует позиции +1). Пробы инкубировали 10 мин при 37°C (концентрации компонентов указаны в подписях к рисункам), после чего проводили обратную транскрипцию (30 мин при 37°C). Для анализа продуктов обратной транскрипции использовали 6% денатурирующий ПААГ.

Авторы выражают благодарность М. Дрейфусу за предоставление штамма *E. coli* ENSO (HfrG6Δ12) и плазмиды pEMBLΔ46; В.И. Махно за препарат 30S рибосомных субчастиц, Н.В. Скапцовой за синтез олигонуклеотидов. Работа финансировалась грантами РФФИ № 97-04-48834 и № 00-04-48-115.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gold L. // Ann. Rev. Biochem. 1988. V. 57. P. 199–233.
2. McCarthy J.E.G., Gualerzi C. // Trends in Genetics. 1990. V. 6. P. 78–85.
3. de Smit M.H. // RNA Structure and Function / Eds R.W. Simons, M. Grunberg-Manago. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. P. 495–540.
4. Shine J., Dalgarno L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 1342–1346.
5. Hui A., de Boer H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4762–4766.
6. Jacob W.F., Santer M., Dalberg A.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 4757–4761.
7. de Smit M.H. Regulation of Translation by mRNA Structure. Ph. D. Thesis, Leiden, The Netherlands: Leiden University, 1994. P. 118.
8. de Boer H.A., Comstosk L.J., Hui A., Wong E., Vasser M. // Biochem. Soc. Symp. 1984. V. 48. P. 233–244.
9. Farwell M.A., Roberts M.W., Rabinowitz J.C. // Mol. Microbiol. 1992. V. 6. P. 3375–3383.
10. de Smit M.H., van Duin J. // J. Mol. Biol. 1994. V. 235. P. 173–184.
11. Ringquist S., Shinedling S., Barrick D., Green L., Binkley J., Stormo G.D., Gold L. // Mol. Microbiol. 1992. V. 6. P. 1219–1229.
12. Ringquist S., Jones T., Snyder E.E., Gibson T., Boni I., Gold L. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 3640–3648.
13. Dreyfus M. // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. P. 79–94.
14. Артамонова В.С., Царева Н.В., Бони И.В. // Био-орган. химия. 1998. Т. 12. С. 530–538.
15. Boni I.V., Artamonova V.S., Dreyfus M. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 5872–5879.
16. Vellanoweth R.L., Rabinowitz J.C. // Mol. Microbiol. 1992. V. 6. P. 1105–1114.
17. Yarchuk O., Jacques N., Guilleres J., Dreyfus M. // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 581–596.
18. de Smit M.H., van Duin J. // J. Mol. Biol. 1994. V. 244. P. 144–150.
19. Internet address: <http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/>
20. Joyce S.A., Dreyfus M. // J. Mol. Biol. 1998. V. 282. P. 241–254.
21. Hartz D., McPheeters D.S., Traut R., Gold L. // Methods Enzymol. 1988. V. 164. P. 419–425.
22. Balakin A.G., Bogdanova S.L., Skripkin E.A. // Biochemistry International. 1992. V. 27. P. 117–129.
23. Hartz D., McPheeters D.S., Green L., Gold L. // J. Mol. Biol. 1991. V. 218. P. 99–105.
24. Freier S.M., Kierzek R., Jaeger J.A., Sugimoto N., Caruthers M.H., Neilson T., Turner D.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 9373–9377.
25. Balakin A., Skripkin E., Shatsky I., Bogdanov A. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1050. P. 119–223.
26. Herschlag D. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 20871–20874.
27. Tzareva N.V., Makhno V.I., Boni I.V. // FEBS Lett. 1994. V. 337. P. 189–194.

Extensive Complementarity of the Shine–Dalgarno Region and 3'-End of 16S rRNA Is Inefficient for Translation *in vivo*

A. V. Komarova, L. S. Tchufistova, E. V. Supina, and I. V. Boni

e-mail: stasy@humgen.siobc.ras.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Translation initiation in *Escherichia coli* involves as a rule complementary interactions between a Shine–Dalgarno (SD) sequence upstream of the initiation codon and a highly conserved 3'-end sequence of 16S rRNA (anti-SD). The translation efficiency is believed to be directly affected by the affinity of the ribosome to the mRNA initiation region. Earlier, high-affinity RNA ligands to *E. coli* ribosomes were selected by the SELEX approach, with the ligands containing an extended SD-sequence well represented. In this work, we examined the ability of artificial ribosome binding sites (RBSs) containing such an extended (10-nt) SD-sequence (superSD) to drive translation *in vivo*, as well as its ability to form the translation initiation complex *in vitro*. Toe-print experiments showed the formation of a ternary initiation complex on mRNA comprising superSD. Moreover, they proved the formation of an extended SD-duplex in the binary 30S–mRNA complex. Nevertheless, the superSD appeared to be inefficient in translation *in vivo*. We believe that the initiation complex involving a superSD-element is too stable to be functional; it may impede the transition from initiation to elongation, thus disrupting the transcription–translation coupling and inhibiting the formation of polysomes. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: Shine–Dalgarno (SD) sequence, translation initiation