

# Филогенетический анализ структурных предпосылок аутогенного контроля экспрессии генов *rplJL* оперона на уровне трансляции представителей $\gamma$ -протеобактерий

И. В. Крупская, Е. Б. Патон<sup>1</sup>

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

<sup>1</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина

i.v.kroupskaya@imb.org.ua

---

*Проведен филогенетический анализ структурных предпосылок аутогенной регуляции экспрессии генов *rplJL* оперона у представителей  $\gamma$ -протеобактерий на уровне трансляции. Исследованы структурные предпосылки взаимодействия рибосомного белка L10 с мРНК. Показано, что у представителей  $\gamma$ -протеобактерий аутогенный контроль экспрессии генов L10 белка осуществляется по тому же механизму, что и у *Escherichia coli*, за исключением эндосимбионтов.*

---

*Ключевые слова: аутогенный контроль, экспрессия генов, рибосомный белок L10, мРНК, сайт связывания.*

---

**Введение.** Аутогенный контроль экспрессии генов, кодирующих рибосомные белки, является типичным для прокариотных организмов [1–3]. Ауторегуляция генов *rplJL*, кодирующих рибосомные белки L10 и L12, осуществляется на уровне трансляции посредством белка-регулятора L10 или же комплексом L8 (L10:4L12) [4, 5]. Белок-регулятор способен конкурентно связываться с последовательностью-мишенью как на мРНК, так и на рРНК. В случае, когда синтез упомянутого белка избыточен по отношению к синтезу рРНК, L10 или же комплекс L10:4L12, связываясь с сайтом-мишенью на мРНК, блокирует трансляцию собственного и сопряженного с ним цистронов [2, 3]. Одновременное блокирование инициации трансляции обоих цист-

ронов (L10 и L12) происходит благодаря связыванию белка L10 с мРНК-мишенью, расположенной в нетранслируемой 5'-области первого из них, и в результате прочного спаривания между удаленными более чем на 500 нуклеотидов от сайта инициации трансляции белка L10 5'-концевыми участками названных цистронов единой мРНК [4, 5]. Полагают, что у *Escherichia coli* лидерная область перед геном *rplJ* может существовать в термодинамически равновесных конформациях — транскрипционно активной («открытой») и заблокированной («закрытой») [6]. Предполагается, что связывание L10 белка возможно лишь с «закрытой» формой *rplJ*-лидера.

Учитывая уже известные данные [7], цель данной работы состояла в поиске и исследовании структурных предпосылок для осуществления ме-

ханизма аутогенного контроля экспрессии гена *rplJ* у представителей гамма-протеобактерий. Структурный анализ включал поиск и характеристику структуры мРНК-мишени для белка L10; построение модели вторичной структуры лидерной последовательности гена *rplJ*, а также поиск структурных предпосылок для сопряжения трансляции L10 и L12 цистронов за счет спаривания 5'-областей этих цистронов.

Данные о нуклеотидных последовательностях, относящихся к гамма-протеобактериям, получены нами из базы данных NCBI, TIGR Microbial Database, Sanger Centre, Joint Genome Institute, University of Washington, University of Wisconsin. Для поиска генов *rplJL* бактерий с неполностью секвенированными геномами использовали BLAST 2.0 на NCBI BLAST.

Были исследованы гена следующие представители гамма-протеобактерий:

*Enterobacteriales*: *Buchnera aphidicola* str. APS NC\_002528; *Candidatus Blochmannia floridanus* NC\_005061; *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043; *Erwinia chrysanthemi* str. 3937; *Escherichia coli* K12 NC\_000913; *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi NC\_0031; *Salmonella enteritidis* NC\_003455; *Salmonella paratyphi*; *Salmonella typhimurium* DT104 NC\_002056; *Shigella dysenteriae* M131649; *Shigella flexneri* 2a str. 301 NC\_002773; *Shigella sonnei* 53G NC\_002809; *Wigglesworthia glossinidia endosymbiont of Glossina brevipalpis* NC\_005139; *Yersinia enterocolitica* (type 0:8) NC\_002120; *Yersinia pestis* CO92 NC\_003143;

*Pasteurellaceae*: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* NK 1651; *Haemophilus ducreyi* 35000HP NC\_002940; *Haemophilus influenzae* Rd KW20 NC\_000907; *Haemophilus somnus* 129PT NC\_002664; *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E NC\_006300 *Pasteurella multocida* NC\_001774;

*Pseudomonadaceae*: *Pseudomonas aeruginosa* PA01 NC\_002516; *Pseudomonas fluorescens* SBW25; *Pseudomonas putida* KT2440 NC\_002947; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a NC\_002759;

*Vibrionaceae*: *Photobacterium profundum* SS9 NC\_006370, *Vibrio cholerae* O1 biovar eltor str. N16961 NC\_004982; *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 NC\_002088; *Vibrio vulnificus* CMCP6 NC\_004459; *Vibrio vulnificus* YJ016 NC\_005139;

*Xanthomonadaceae*: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913 NC\_003902; *Xylella*

*fastidiosa* 9a5c NC\_002490; *Xylella fastidiosa* Temeculal NC\_002144;

Others: *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270; *Colwellia psychrerythraea* 34H; *Coxiella burnetii* RSA 493; *Legionella pneumophila*; *Methylococcus capsulatus* str.; *Shewanella oneidensis* MR-1 NC\_004347.

Первичные последовательности ДНК сравнивали с использованием программы CLUSTAL W [8].

Модели вторичной структуры *rplJ* лидера построены с помощью программ RNAFOLD [9] (из пакета программы PC GENE) и RNADRAW [10].

Ранее мы сообщали о высокой степени консервативности структуры сайта связывания регуляторного рибосомного белка L10 с мРНК у семи представителей рода энтеробактерий: *S. marcescens*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. freundii*, *E. cloacae* и *K. pneumoniae* [7]. При поиске сайта связывания белка L10 на мРНК у представителей данного семейства учитывали два обстоятельства.

Во-первых, во всех известных на сегодня как м-, так и рРНКовых мишенях L10 белка прокариотов присутствуют элементы AGA и C-G пара, соседствующая с неспаренным А, а также элемент UUAA (рис. 1), характерный для мРНКовых участков связывания белка L10 так называемого энтеробактериального типа [11–14]. Сайты взаимодействия L10 с мРНК у представителей  $\gamma$ -протеобактерий обладают рядом консервативных структурных элементов и четко выраженным структурным сходством с областью связывания с L10 на 23SPHK (рис. 1). Функциональная значимость этих элементов подробно обсуждалась ранее [7].

Во-вторых, все известные на сегодня мРНКовые мишени белка L10 значительно удалены от сайта инициации трансляции L10-цистрона (примерно на 150 п. н.) и обнаруживают очевидную структурную гомологию с участком связывания на 23S рРНК. На основании проведенного сравнительного анализа нами построена консенсусная модель вторичной структуры сайта связывания белка L10 на мРНК. Как видно из данных рис. 1, все перечисленные выше характерные элементы мРНК сайта связывания L10 белка (на рис. 1 эти последовательности отмечены жирным шрифтом) сохраняются для организмов гамма-протеобактерий.

Исходя из определенной первичной последовательности мРНК *rplJ* лидеров представителей  $\gamma$ -протеобактерий очевидно, что их общая структурная организация (рис. 2, а) консервативна. При

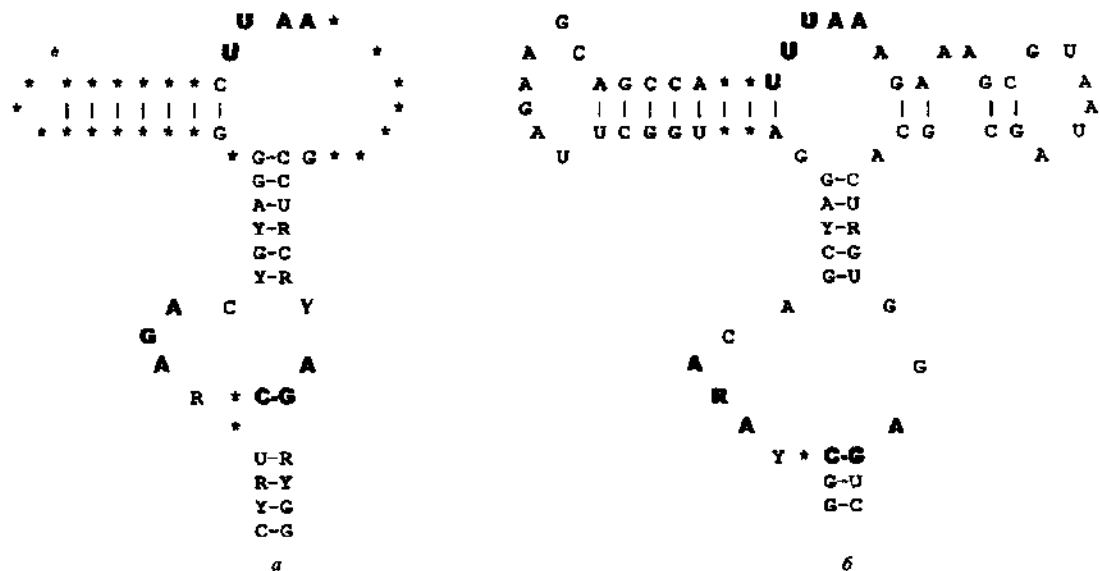


Рис. 1. Вторичная структура сайта связывания регуляторного белка L10 на мРНК и на 23S рРНК: общий консенсус, выведенный для участка связывания L10 на мРНК (а) и 23S рРНК (б). Консервативные нуклеотиды обозначены буквами, переменные — звездочками. Y и R соответственно C, U и G, A

этом сохраняются характерные для *E. coli* [4] пять двухцепочечных (ds) и пять одноцепочечных (ss) участков. Участки dsIV и dsIII наиболее консервативны, что коррелирует с их ключевой ролью в ауторегуляции экспрессии генов *rplJL* [7]. DsIV содержит сайт связывания регуляторного белка L10 (L8). DsIII предположительно может существовать в двух альтернативных формах, соответствующих трансляционно активному и заблокированному состояниям мРНК L10-L12. Последовательности 5'-CC-RUC-3' и 5'-GRUGG-3', которые за счет альтернативного спаривания обеспечивают возможность перестройки структуры лидера мРНК L10-L12, оказались консервативными у всех проанализированных представителей  $\gamma$ -протеобактерий. Таким образом, предположение о конформационном переходе, лежащем в основе регуляции трансляции мРНК L10-L12 как *E. coli* [4], так и шести видов энтеробактерий [15] правомерно и для исследуемых представителей  $\gamma$ -протеобактерий.

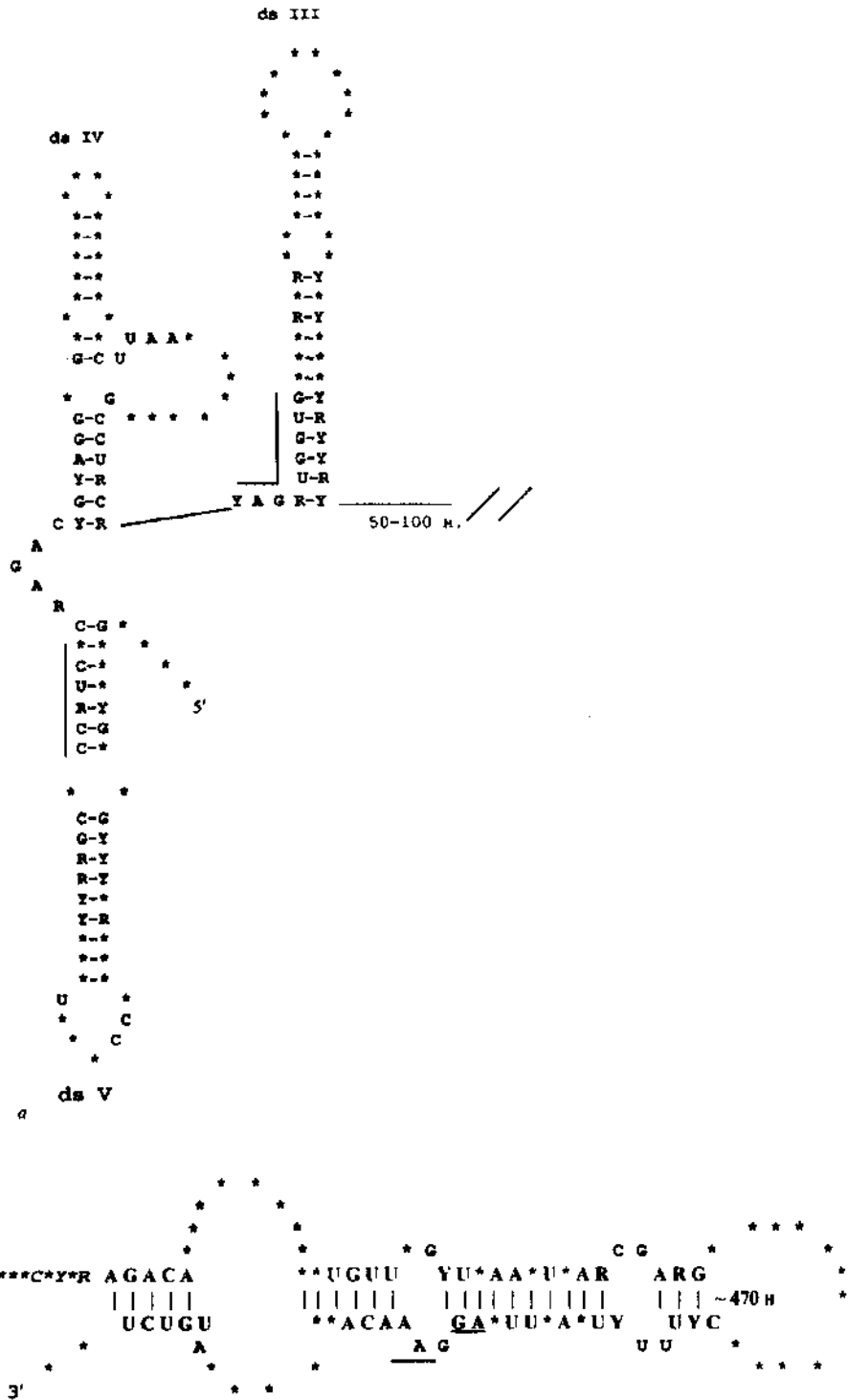
Механизм ауторегуляции трансляции генов *rplJL* оперона предполагает, что связывание белка L10 с лидерной областью мРНК L10-L12 блокирует трансляцию обоих цистронов. Структурной предпосылкой сопряженной трансляции L10 и L12 цистронов у *E. coli* является спаривание удаленных участков 1738—1773 — L10 цистрон и 2256—2290 — L12 цистрон мРНК L10-L12 [16]. Аналогичные области консервативны у всех представителей  $\gamma$ -

протеобактерий, что обеспечивает возможность подобного спаривания (рис. 2, б). Все это позволяет предположить наличие одного и того же механизма сопряжения трансляции названных цистронов у рассматриваемых представителей.

Следует отметить, что у представителей *Pseudomonadaceae* локализация участков, вовлеченных в спаривание и приводящих к блокированию сопряженных цистронов, отличается от остальных представителей  $\gamma$ -протеобактерий. Данный факт можно объяснить филогенетической удаленностью *Pseudomonadaceae* от других групп  $\gamma$ -протеобактерий. Для некоторых представителей  $\gamma$ -протеобактерий не обнаружено структурных предпосылок регуляции трансляции белка L10, например, для *Buchnera sp.*, *S. ruddii*, *X. fastidiosa*, относящихся к организмам-паразитам.

Отсутствие структурных предпосылок может быть объяснено эндосимбиотическим образом жизни этих организмов [17, 18]. Для эндосимбионтов характерно также отсутствие перед геном *rplK* сайта связывания для белка L1 (неопубликованные данные). Это дает основание полагать, что кластер *rplKAJL* не регулируется белком L1. Гены *rplJL* входят в кластер *rplKAJL* у всех эндосимбионтов, следовательно, правомочно сделать предположение об участии *NusG* гена в регуляции экспрессии генов *rplJL*.

С получением кристаллов РНК и определени-



Схематическое изображение мРНК L10-L12. Консensusные модели вторичной структуры: а — участка *rplI* лидера мРНК; б — мРНК в области сопряженной трансляции L10 и L12 цистронов. Буквами обозначены консервативные нуклеотиды, итами — переменные. Y и R соответственно C, U и G, A

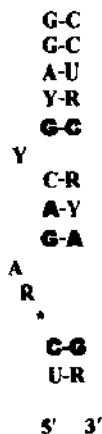


Рис. 3. Консенсусная структура K-turn мотива для мРНК белка L10

ем ее атомной структуры стало возможным идентифицировать ранее неизвестные мотивы РНК, так называемые гибкие молекулярные стержни — kink-turn (K-turn или GA) мотивы, приводящие к крутому изгибу в двойной спирали РНК и являющиеся важным участком для белкового узнавания [19-21]. K-turn — это асимметричная внутренняя петля, фланкированная С-Г парой с одной стороны и G-A парой — с другой. Этот мотив узнается девятью из 31 белка большой субъединицы 23S рРНК: L4, L7Ae, L10, L15e, L19e, L24, L29, L32e и L37Ae. Сайт связывания белка L10 на мРНК аналогичен КТ-42 в 78-й петле 4-го домена 23S рРНК *E. coli* [16]. Нами построена модель консенсусной структуры K-turn мотива для мРНК белка L10 представителей  $\gamma$ -протеобактерий, приведенная на рис. 3. На основании этой модели можно сделать вывод о наличии дополнительных структурных элементов, участвующих в аутогенном контроле экспрессии генов *rpIJL* оперона.

Таким образом, проведенный нами филогенетический анализ аутогенного контроля экспрессии генов *rpIJL* у представителей гамма-протеобактерий подтвердил, что данные гены регулируются по классическому для прокариотов принципу обратной связи и имеют для этого все необходимые структурные предпосылки, а именно: сайт связывания для рибосомного белка L10 на мРНК; вторичную структуру лидерной области, обеспечивающую конформационный переход, лежащий в основе регуляции трансляции мРНК L10-L12, а также условия для сопряженной трансляции L10 и L12 цистронов.

I. V. Kroupskaya, E. B. Paton

Phylogenetic analysis of structural preconditions of autogenous control of gene expression of *rpIJL* operon at the translation level in  $\gamma$ -proteobacteria

Summary

Phylogenetic analysis of structural preconditions of autogenous control regulation of gene expression of *rpIJL* operon at the translation level in  $\gamma$ -proteobacteria has been performed. The structural preconditions of both L10 ribosomal protein and its RNA targets, which determine the possibility and the specificity of L10-RNA interaction have been studied. Phylogenetic comparison provides evidence for similarity of structural preconditions of the feedback regulation mechanism in  $\gamma$ -proteobacteria and *Escherichia coli*, except for the endosymbiontis.

Keywords: autogenous control, gene expression, L10 ribosomal protein, mRNA, interaction site.

I. В. Крупська, Е. Б. Патон

Філогенетичний аналіз структурних передумов аутогенного контролю експресії генів *rpIJL* оперона на рівні трансляції у представників  $\gamma$ -протеобактерій

Резюме

Здійснено філогенетичний аналіз структурних передумов аутогенної регуляції експресії генів *rpIJL* оперона у представників  $\gamma$ -протеобактерій на рівні трансляції. Досліджено структурні передумови взаємодії рибосомного білка L10 з мРНК. Доведено, що у представників  $\gamma$ -протеобактерій аутогенний контроль експресії генів L10 білка відбувається за тим самим механізмом, що й у *Escherichia coli*, за виключенням ендосимбіонтіс.

Ключові слова: аутогенний контроль, експресія генів, рибосомний білок L10, мРНК, сайт зв'язування.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Post L. E., Strycharz G. D., Nomura M., Lewis H., Dennis P. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit B in *E. coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76.—P. 1697—1701.
2. Zengel J. M., Lindahl L. Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli* // Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.—1994.—47.—P. 331—370.
3. Nomura M. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components // Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol. Regulation of Gene Expression / Eds I. Both, C. Higgins.—Cambridge: Univ. press, 1986.—P. 199—220.
4. Sor F., Nomura M. Cloning and DNA sequence determination of the L11 ribosomal protein of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris* L11 operon by heterologous L1 protein // Mol. and Gen. Genet.—1987.—210.—P. 52—59.
5. Clímie S. C., Friesen J. D. Feedback regulation of the *rpIJL-rpoBC* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure // J. Mol. Biol.—1987.—198.—P. 371—381.
6. Friesen J. D., Tropak M., An G. Mutations in the leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // Cell.—1983.—32.—P. 361—369.

Патон Е. Б. Особенности регуляции экспрессии генов кластера *rplKALJ* // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 5.—С. 5—23.

Thomson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res.—1994.—22.—P. 4673—4680.

Zuker M., Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamic and auxiliary information // Nucl. Acids Res.—1981.—9.—P. 133—148.

Matzura O., Wennborg A. RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows // Comp. Appl. BioSci. (CABIOS).—1996.—12.—P. 247—249.

Christensen T., Johnson M., Fill N. P., Frisen J. D. RNA secondary structure and translation inhibition: analysis of mutants in the *rplJ* leader // EMBO J.—1984.—3.—P. 1609—1612.

Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Общий механизм регуляции экспрессии в *rplJL* опероне энтеробактерий подтверждается консервативностью структурной организации лидерной области мРНК. Регуляторный консенсус лидерной области мРНК L10-L12 энтеробактерий // Докл. НАН Украины.—1995.—340, № 1.—С. 104—107.

Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Наличие сайта связывания с рибосомным белком L10 в нетранслируемой последовательности перед геном *rplJ* *Thermotoga maritima* указывает на аутогенный контроль экспрессии этого гена // Генетика.—1996.—32, № 1.—С. 139—143.

Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Доказательство аутогенной

- регуляции экспрессии гена *rplJ* у *Thermotoga maritima* и возможности перекрестной регуляции экспрессии по этому принципу между *T. maritima* и энтеробактериями // Молекуляр. генетика.—1997.—33, № 10.—С. 1341—1344.
15. Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Общий механизм регуляции экспрессии в *rplJL* опероне энтеробактерий подтверждается консервативностью структурной организации лидерной области мРНК. Регуляторный консенсус лидерной области мРНК L10-L12 энтеробактерий // Докл. НАН Украины.—1995.—340, № 1.—С. 104—107.
  16. Petersen C. Long-rang translational coupling in the *rplJL-rpoBC* operon of *Escherichia coli* // J. Mol. Biol.—1989.—206.—P. 323—332.
  17. Charles H., Mouchiroud D., Lobry J., Goncaves I., Rahbe Y. Gene size reduction in the bacterial aphid endosymbiont *Buchnera* // Mol. Biol. Evol.—1999.—16.—P. 1820—1822.
  18. Clark H., Baumann L., Thao M. L., Moran N. A., Baumann P. Degenerative minimalism in the genome of a psyllid endosymbiont // J. Bacteriol.—2001.—183.—P. 1853—1861.
  19. Klein D. J., Schmeing T. M., Moore P. B., Streitz T. A. The kink-turn: a new RNA secondary structure motif // EMBO J.—2001.—20.—P. 4214—4221.
  20. Matsumura S., Ikawa Y., Inoue T. Biochemical characterization of the kink-turn RNA motif // Nucl. Acids Res.—2003.—31.—P. 5544—5551.
  21. Razga F., Spackova N., Reblova K., Koca J., Leontis N. B., Sponer J. Ribosomal RNA kink-turn motif — a flexible molecular hinge // J. Biomol. Struct. and Dyn.—2004.—22.—P. 183—194.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 22.06.06