



УДК 677.21

А. М. Живолюб, Є. Б. Патон

МОЖЛИВІСТЬ ГЕТЕРОЛОГІЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ОПЕРОНУ *rplJL* *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* БІЛКОМ *L10* *ESCHERICHIA COLI*

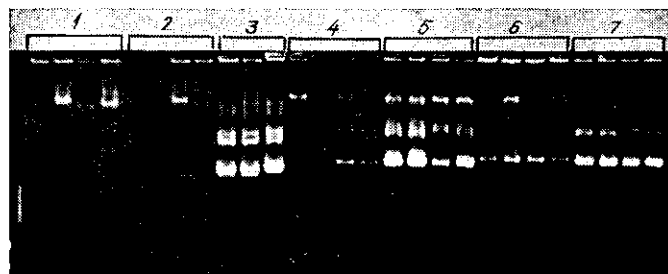
Показано можливість досягнення високої ефективності трансформації *K. pneumoniae* методом електропорації. Виявлено регуляторну здатність білків *L10* *E. coli* з нативною та зміненою первинною структурою стосовно генів оперону *rplJL* *K. pneumoniae*.

Продовжуючи наші дослідження з вивчення можливості регуляції експресії генів *rplJL* оперону ентеробактерій гетерологічними білками *L10* [1, 2], ми провели аналіз впливу суперпродукції білків *L10* *E. coli* (нативного та із зміненою первинною структурою) на клітини *K. pneumoniae*. Як реципієнт використовували штам *K. pneumoniae* NCTC 5054 (National collection of type cultures, Central Public Health Laboratory, Лондон, Великобританія). Плазмідну ДНК до клітин-реципієнтів вводили методом електропорації, який був описаний нами раніш для *Salmonella typhimurium* [2]. Слід особливо відзначити, що нас цікавив вибір оптимального засобу введення чужорідної ДНК щодо ряду ентеробактерій. До теперішнього часу ми порівняли ефективність введення плазмідної ДНК до *E. coli*, *S. typhimurium* і *K. pneumoniae* за посередництвом трансформації клітин, які обробляли CaCl_2 за стандартною методикою [3], її модифікаціями [4] та електропорацією [2, 5]. Експерименти виявили, що введення плазмід, котрі нас цікавили, до клітин *E. coli* є найбільш ефективним за допомогою трансформації CaCl_2 -клітин за стандартною методикою та її модифікаціями [3]. Щодо *S. typhimurium* і *K. pneumoniae*, навпаки, найбільшої ефективності можна досягти електропорацією. Виявилось, що клітини *E. coli* набагато чутливіші до концентрації солі у розчині ДНК, який використовують для електропорації, і підвищення температури у процесі впливу на клітини електричним імпульсом. У попередніх дослідках було виявлено пряму залежність ефективності електропорації клітин *K. pneumoniae* від ємкості конденсаторної батареї (тривалості імпульсу) та напруги електричного поля аж до величин 14,5 мФ і 27 кВ/см відповідно. Ефективність трансформації при цьому складала приблизно 10^7 колоній на 1 мкг ДНК плазмиди *19XmaCAT* (Cm^r-похідної від *pUC19*). Ці ж умови було використано і в подальшому для введення плазмід, які забезпечують експресію білків *L10*. Нас цікавив ефект підвищеного синтезу у клітинах *K. pneumoniae* нативного білку *L10* *E. coli*, котрий у випадку збереження регуляторної здатності у гетерологічному хазяїні призводив би до характерного ефекту — негативному впливу підвищеної продукції *L10* на життєздатність клітин-хазяїв. Цей негативний ефект виявляється через уповільнення швидкості росту клітин та зниження копійності плазмід, які кодують регуляторноздатні білки [2].

У даній роботі проведено порівняння впливу високих рівнів продукції у *K. pneumoniae* білків *L10* з різною первинною структурою:

© О. М. ЖИВОЛУП, Є. Б. ПАТОН, 1992

нативного білку *L10 E. coli*, який продукується з *pEP20* і *pEP20-1* [2], *L10* з делецією 22 С-кінцевих амінокислот (*pEP14*) і мутацією Lys143, Glu144→Gln (*pEP22*) [6]. Як контроль використовували *pEP12-1*, з якої продукувався *L10* з делецією 45 С-кінцевих амінокислот, що призводить до втрати регуляторної здатності цього білку [6]. На малюнку наведено результати електрофорезу ДНК вищезгаданих плазмід, яку виділяли лужним методом [3] з трансформованих клітин *K. pneumoniae*. Як видно, копійність плазмід *pEP20* та *pEP20-1* значно нижча за



Електрофоретичний розподіл ДНК плазмід, виділених з аліквот рідкої культури *K. pneumoniae*: 1—4, 6 — плазміді *pEP20*, *pEP20-1*, *pEP12-1*, *pEP14* та *pEP22*, виділені з клітин з *Lac*⁺-фенотипом; 5, 7 — плазміді *pEP14* і *pEP22* з клітин з *Lac*⁻-фенотипом

pEP12-1. Таким чином, білок *L10 E. coli* здатний регулювати експресію генів *rplJL K. pneumoniae* (пригнічувати синтез білку *L12*, який кодується геном *rplL* хромосоми). Дуже цікавим є той факт, що білки із зміненою первинною структурою (делецією 22 С-кінцевих амінокислотних залишків та мутацією Lys143, Glu144 → Gln), які не володіють регуляторною здатністю у клітинах *E. coli* [1] та *S. typhimurium* [2], негативно впливали на клітини *K. pneumoniae* (копійність плазмід *pEP14* та *pEP22* у цих клітинах помітно знижувалася у порівнянні з контрольною плазмідною *pEP12-1*). Це спостереження корелює з відзначеною Сором і Номурою [7] різницею у регуляторній спроможності білку *L1 E. coli* стосовно власної і гетерологічних (*Serratia marcescens* і *Proteus vulgaris*) мішеней на мРНК.

Ще один з відзначених нами феноменів — залежність ступеню негативного ефекту регуляторноздатних білків *L10* від *Lac*-фенотипу клітин-хазяїв *K. pneumoniae*. Як можна помітити (див. малюнок), у *Lac*⁺-клітинах *K. pneumoniae* (вихідний штам) копійність плазмід *pEP14* та *pEP22* була значно нижчою, ніж у клітинах з *Lac*⁻-фенотипом (спонтанна мутація). *Lac*⁺-фенотип поглибив негативний вплив присутності у клітинах *K. pneumoniae* плазмід *pEP20* та *pEP20-1*. Причину цього явища поки що не з'ясовано. Експериментально показано токсичність для клітин *E. coli* суперпродукції β-галактозидази [8]. Тому на даному етапі досліджень можна припустити, що продукція β-галактозидази поглиблює негативний ефект збільшеного синтезу регуляторноспроможних білків *L10* у клітинах *K. pneumoniae*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Evidence for the ability of *L10* ribosomal proteins of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* to regulate *rplJL* gene expression in *Escherichia coli* / E. B. Paton, M. I. Woodmaska, I. V. Kroupskaya et al. // FEBS Let.—1990.—265, N 1, 2.— P. 129—132.
2. Живолюб А. Н., Кириченко И. В., Патон Е. Б. Рибосомный белок *L10 Escherichia coli* способен регулировать экспрессию генов *rplJL Salmonella typhimurium* // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.— С. 37—39.
3. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab.—1982.—545 p.
4. Merrick M. J., Gibbins J. R., Postgate J. R. A rapid and efficient method for plasmid transformation *K. pneumoniae* and *E. coli* // J. Gen. Microbiol.—1987.—133, N 8.— P. 2053—2057.

5. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16, N 13.— P. 6127—6145.
6. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолун А. Н. Определение минимального сегмента рибосомного белка *L10 E. coli*, сохраняющего регуляторную функцию // Докл. АН СССР.— 1989.— 309, № 2.— С. 493—496.
7. Sor F., Nomura M. Cloning and DNA sequence determination of the *L11* ribosomal protein operon of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris*: Translation feedback regulation of the *Escherichia coli L11* operon by heterologous *L1* proteins // Mol. and Gen. Genet.— 1987.— 210, N 1.— P. 52—59.
8. Linn T., Pierre R. S. Improved vector system for construction transcriptional fusions that ensures independent translation of *lacZ* // J. Bacteriol.— 1990.— 172, N 2.— P. 1077—1084.

Ин-т клітин. біології і генет. інженерії АН України,
Київ

Одержано 04.11.91.

УДК 577.217.5; 577.18.02

Н. І. Шульга, А. П. Потапов

ВПЛИВ НЕОМІЦИНУ НА ТРАНСЛЯЦІЮ ПОЛІ (U) І ПОЛІ (dT) У БЕЗКЛІТИННИХ БІЛОКСИНТЕЗУЮЧИХ СИСТЕМАХ З *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ТА *NEUROSPORA CRASSA*

Вивчено вплив різних концентрацій іонів магнію і аміноглікозидного антибіотика неоміцину на трансляцію полі(U) і полі(dT) у безклітинних білоксинтезуючих системах з *S. cerevisiae* та *N. crassa*. Показано, що трансляція полі(U) і полі(dT) здійснюється цитоплазматичними рибосомами. Підвищені концентрації іонів магнію стимулюють трансляцію полі(dT), неоміцин на відміну від прокариотичних систем пригнічує трансляцію обох матриць. Висловлено припущення про еволюцію структури декодуючого центру рибосоми у напрямі зростання вибірковості відносно структури сахаро-фосфатного кістяка матриці.

Вступ. Гіпотеза про стереоспецифічну стабілізацію кодон-антикодонних комплексів була запропонована для пояснення селекції аміноацил-тРНК на рибосомі [1, 2]. Вона постулює пряму взаємодію декодуючого центру рибосоми з сахаро-фосфатним кістяком кодон-антикодонних комплексів, завдяки чому рибосома «ощінює» стеричні параметри останніх. Висувається припущення, що зміна стереохімічних параметрів кодон-антикодонних дуплексів або декодуючого центру здатна суттєво впливати на точність процесу трансляції.

Природним полімером із зміненим сахаро-фосфатним кістяком є ДНК. Паралельне дослідження трансляції полі(U) і полі(dT) у безклітинних системах з прокариот показало, що підвищені концентрації іонів Mg^{2+} і антибіотик неоміцин пригнічують синтез поліфенілаланіну на матриці полі(U) і розблоковують трансляцію полі(dT) [3, 4]. Здатність систем зчитувати полінуклеотид може змінюватися за принципом «або рибо-, або дезоксирибоматриця». Ці дані свідчать про високу чутливість прокариотичних рибосом до структури сахаро-фосфатного кістяка матриці. Поряд з цим було виявлено, що рибосоми з вищих еукариот мають сувору вибірковість щодо структури сахаро-фосфатного кістяка матриці і не здатні змінювати її під впливом іонів магнію і неоміцину [5].

Метою цієї роботи було дослідження специфічності декодуючого центру рибосом з *S. cerevisiae* та *N. crassa* до структури сахаро-фосфатного кістяка синтетичних матриць полі(U) і полі(dT), а також вплив різних концентрацій неоміцину на зміну цієї специфічності.

Матеріали і методи. Використовували штами з Всесоюзної колекції мікроорганізмів: дріжджі *S. cerevisiae* ВКМУ-2549 і *N. crassa* ВКМФ-184 дикого типу. Отримання біомаси клітин дріжджів, їх руй-