

Ф. А. Терещенко, Е. Б. Патон

## ПОИСК КОНСЕРВАТИВНЫХ СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В РИБОСОМНОМ БЕЛКЕ L10 НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ АУТОГЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *rpmJL*- ОПЕРОНА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Проведен поиск элементов структурной организации белка L10, которые необходимы для взаимодействия этого белка с мРНКовыми мишенями, лежащего в основе выполнения белком L10 функции аутогенной регуляции экспрессии генов *rpmJL* энтеробактерий. Во взаимодействии с мРНКовыми мишенями у энтеробактерий могут участвовать следующие структурные элементы L10: мотив *-kNTII-*, мотив *-Eif-* и структура альфа-бета-альфа (98—111).

Экспрессия генов оперона *rpmJL* энтеробактерий [1—3] и, возможно, других прокариот осуществляется аутогенно в результате конкурентного связывания регуляторного для этого оперона белка L10 с сайтами-мишенями на матричной и 23S рибосомной РНК. Когда количество L10 в клетке превосходит необходимое для сборки рибосом, белок L10 (или L8 — комплекс L10:4×L12) связывается с лидерной областью мРНК L10—L12 и, таким образом, блокирует трансляцию как собственного (L10), так и сопряженного с ним (L12) цистронов мРНК. Ранее мы показали, что структура области мРНК, участвующей в аутогенной регуляции (сайт взаимодействия с L10 и лидерная область мРНК L10—L12), высококонсервативна у энтеробактерий [4]. Консервативностью организации обеспечивается как общность механизма аутогенной регуляции, так и возможность перекрестной регуляции экспрессии генов *rpmJL*-оперона у энтеробактерий. Последнее свидетельствует в пользу того, что структурные элементы, необходимые для осуществления «feedback» регуляции, консервативны и у регуляторного белка, и у его рибонуклеиновой мишени.

Мы провели поиск консервативных структурных элементов регуляторного белка L10, которые могут быть существенными для взаимодействия с мРНК, руководствуясь следующими логическими посылками. Сайты взаимодействия L10 с мРНК семи видов энтеробактерий, у которых принцип аутогенной регуляции экспрессии генов *rpmJL* доказан, обладают рядом консервативных структурных элементов и четко выраженным структурным сходством с областью связывания с L10 на 23S РНК [4, 5] (рис. 1). В свою очередь, область связывания L10 на рибосомной РНК большой субъединицы высокоомологична у про- и эукариот [5]. Исходя из этого мы предположили, что во взаимодействии с консервативными по структурной организации элементами нуклеиновой мишени должны участвовать консервативные по структуре элементы регуляторного белка L10. Имея конечной целью установление такой области для белка *Escherichia coli*, мы сопоставили известные на сегодняшний день последовательности белков L10 семнадцати организмов как про-, так и эукариотического происхождения (*Dyctiostelium discoideum*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Halobacterium cutirubrum*, *H. halobium*, *H. marismortui*, *Methanococcus vannielii*, *Sulfolobus solfataricus*, *Synechocystis sp.*, *Thermotoga maritima*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Strep-*

*tomyces antibioticus*, *S. griseus*, Citrus greening disease-associated bacterium-like organism), взятых из последней версии GeneBank. Для сравнения использовали программу CLUSTAL, входящую в пакет программ PCGENE.

В результате была установлена лишь одна область -kNtII-, консервативная для всех проанализированных L10-белков. Исходя из расчета вторичной структуры, выполненного с помощью экспертной системы на основе логической имитации [6], область -kNTII- находится в

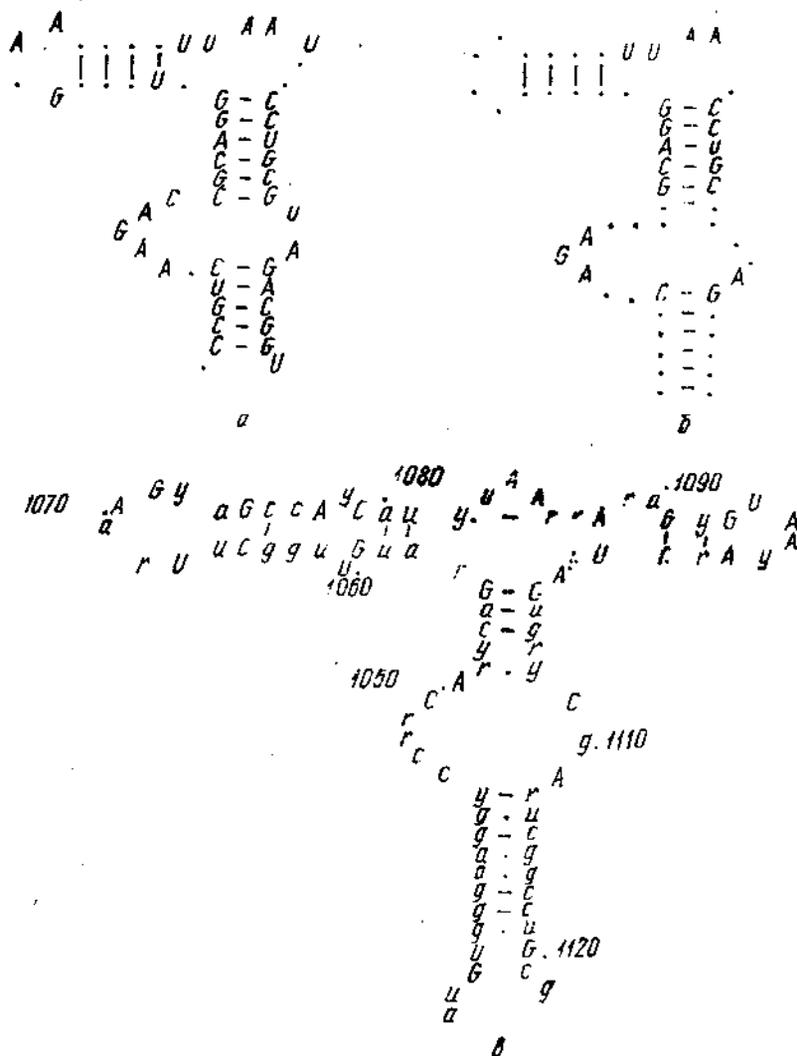


Рис. 1. Вторичные структуры сайтов связывания регуляторного белка L10 на мРНК L10—L12: а — консенсусная, сайт взаимодействия L10 для энтеробактерий [4], б — общий консенсус, выведенный для энтеробактерий *Synechocystis* sp. [11] и *T. muritima* [10]; в — консенсусная структура локуса связывания L10 на 23S РНК, по данным [5]. Обозначения: точка — переменные нуклеотиды; буквы — консервативные нуклеотиды, r и y — пурины и пиримидины соответственно

конформации альфа-спирали. Часть сайта связывания L10 на мРНК находится в двухцепочечной конформации, что позволяет провести аналогию с ДНК-белковым взаимодействием, основной тип которого осуществляется с участием альфа-спиральных сегментов белков [7, 8]. Общей темой для известных в настоящее время РНК-белковых взаимодействий, за счет которых контролируются жизненно важные клеточные процессы, является наличие положительно заряженных аминокислот в реагирующем с нуклеиновой кислотой участке белка. Отсутствие

альтернативы мотиву -kNtII- в белках *L10* свидетельствует в пользу того, что именно он отвечает за связывание с консервативным компонентом рибонуклеиновой кислоты. Интересно здесь то, что данный мотив у белков энтеробактерий (для которых сайт-мишень *L10* доказан [4]), а также *Thermotoga* [10] и *Synechocystis* [11], имеющих потенциальные мишени *L10* в лидерной области мРНК *L10-L12*, условно объединенных нами в связи с этим в группу «feedback+» (Fb<sup>+</sup>), содержит аргинин, а не лизин. Подтверждением того, что мотив -kNtII- участвует в белково-нуклеиновом взаимодействии, посредством которого осуществляется аутогенная регуляция экспрессии генов *rplJL*, служит эффект мутации T57→I (Дж. Фризен, персональное сообщение). В результате этой замены регуляторная способность белка *L10 E. coli* утрачивается. Основываясь на расчетах вторичной структуры, замена T57→I не приводит к изменению вторичной структуры белка. Сопоставление структурной организации сайтов взаимодействия *L10* с м- и рРНК показывает, что первые содержат большее количество консервативных структурных элементов. Поэтому можно считать, что мотивом -kNtII- узнается минимальный набор структурных элементов, консервативных между м- и рРНКовыми сайтами. Во взаимодействии же с дополнительными по сравнению с рРНК структурными элементами мРНКовых мишеней, по-видимому, участвуют другие структурные элементы *L10*, консервативные по своей первичной и/или вторичной структуре. Очень интересной особенностью сайта-мишени *L10* на мРНК является присутствие UAAA-последовательности, консервативной не только для *E. coli* и энтеробактерий [4, 9], но также и для потенциальных мРНКовых сайтов связывания *L10 T. maritima* [10] и *Synechocystis sp.* [11]. Химический анализ *rplJ*-лидера *E. coli* [9] показал, что AA1571—1572 (нумерация приводится по нуклеотидной последовательности *E. coli* [9]) из UAAA-последовательности взаимодействуют с комплексом *L10 : L12*.

Структурные аналоги AA1571—1572 в рРНК как про- [5], так и эукариот [5] расположены вне сайта связывания *L10* и относятся к области взаимодействия с белком *L11*. Мы предположили, что консервативный мотив UAAA является дополнительным структурным элементом мРНКовой мишени *L10* по отношению к рРНКовой, где, возможно, прочность связывания с *L10* достигается в силу кооперативности связывания соседствующих рибосомных белков. В таком случае в связывании с AA1571—1572 участвует либо мотив -kNtII-, либо какая-то другая консервативная область белков *L10*, мишень которых содержит вышеуказанные аденозины. Вероятнее второе предположение, поскольку размеры мотива -kNtII- недостаточны для узнавания элементов, общих для м- и рРНКовых мишеней и дополнительно к упомянутому ранее аденозинам. Мы попытались обнаружить элементы первичной и вторичной структуры *L10*, необходимые для взаимодействия с мРНК и, таким образом, для осуществления «feedback»-регуляции генов *rplJL* энтеробактерий. Для дальнейшего анализа белки *L10* были объединены и сравнивались соответственно для двух групп: Fb<sup>+</sup> и Fb<sup>-</sup> исходя из того, что при аутогенном контроле экспрессии дополнительная консервативность структуры диктуется необходимостью опознания и связывания мРНКовой мишени. К Fb<sup>+</sup> мы отнесли *E. coli* и *S. typhimurium*, для которых аутогенная регуляция экспрессии генов *rplJL* доказана [1], а также *Th. maritima* [10] и *Synechocystis* [11], потенциальные мРНКовые мишени *L10* которых гомологичны по структуре энтеробактериальным и позволяют в силу своей консервативности предположить аутогенный контроль экспрессии генов *rplJL*. Остальные известные к настоящему моменту прокариотические последовательности *L10* были отнесены к Fb<sup>-</sup>. Модификацией N-концевых аргининов, в результате которой *L10* утрачивает способность связывания с РНК [12], а также делеционным мутагенезом белка *L10 E. coli* [13] показано, что с РНК взаимодействует N-конец *L10*, в то время как С-конец (20 концевых аминокислотных остатков) участвует в комплексообразова-



ПОШУК КОНСЕРВАТИВНИХ СТРУКТУРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ  
У РИБОСОМНОМУ БІЛКУ L10, НЕОБХІДНИХ ДЛЯ АУТОГЕННОЇ  
РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *rplJL*-ОПЕРОНУ ЕНТЕРОБАКТЕРІЇ

Резюме

Здійснено пошук елементів структурної організації білка *L10*, необхідних для взаємодії цього білка з мРНКовими мішенями, яка лежить в основі виконання білком *L10* функції аутогенної регуляції експресії генів *rplJL* ентеробактерій. У взаємодії з мРНКовими мішенями у ентеробактерій можуть брати участь наступні структурні елементи *L10*: мотив -kNT11-, мотив -Eif- і структура альфа-бета-альфа (98—111).

F. A. Tereshchenko E. B. Paton

IDENTIFICATION OF THE CONSERVED STRUCTURAL ELEMENTS  
IN THE RIBOSOMAL PROTEIN L10 WHICH ARE ESSENTIAL  
FOR THE AUTOGENOUS REGULATION OF GENE EXPRESSION  
IN THE *rplJL* OPERON OF ENTEROBACTERIA

Summary

We analyzed the structural elements of the ribosomal protein *L10* which are essential for interaction with the mRNA target sites and therefore for execution of the autogenous control of expression of the *rplJL* genes in Enterobacteria.

The following structural elements of the *L10* protein might be essential the feedback regulatory for *L10*-mRNA interaction: the conserved -kNT11-motif, the -Eif-motif and the alpha-beta-alpha (98—111) domain.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Paton E. B., Woodmaska M. I., Kroupskaya I. V. et al. Evidence for the ability of *L10* ribosomal proteins of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* to regulate *rplJL* genes expression in *E. coli* // FEBS Lett.—1990.—265, N 1, 2.— P. 129—132.
2. Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Возможность гетерологичной регуляции экспрессии оперона *rplJL* *Klebsiella pneumoniae* белком *L10* *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—1992.—8, № 3.— С. 37—39.
3. Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Регуляторная способность рибосомного белка *L10* *Escherichia coli* выявлена в отношении экспрессии генов оперона *rplJL* *Citrobacter freundii* // Там же.—1993.—9, № 6.— С. 88—100.
4. Zhyvoloup A. N., Kroupskaya I. V., Lyaskovsky T. M., Paton E. B. Comparison of nucleotide sequences of the *rplJ* leader in *Enterobacteria* // Biopolymers and Cell.—1994.—10, N 1.— P. 37—40.
5. Egebjerg J., Douthwaite S. R., Liljas A., Garrett R. A. Characterization of the binding sites of protein *L11* and the *L10*. (*L12*)<sub>5</sub> pentameric complex in the GTPase domain of 23S ribosomal RNA from *Escherichia coli* // J. Mol. Biol.—1990.—213, N 2.— P. 275—288.
6. Вагус А. Г., Братусь А. В., Василенко В. И. Реализация экспертной системы на основе логической имитации.— Киев: Изд-во Ин-та кибернетики им. В. М. Глушкова, 1987.— 16 с.
7. Nagai K. RNA-protein interactions // Curr. Opin. Struct. Biol.—1992.—2.— P. 131.
8. Lazinski D., Grzadzilska E., Das A. Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif // Cell.—1989.—59, N 1.— P. 207—218.
9. Clime S. C., Friesen J. D. *In vivo* and *in vitro* structural analysis of the *rplJL* mRNA leader of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem.—1988.—263, N 29.— P. 15166—15175.
10. Liao D., Dennis P. P. The organization and expression of essential transcription translation component genes in the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* // Ibid.—1992.—267, N 32.— P. 22787—22797.
11. Schmidt J., Bubunenko M., Subramanian A. R. A novel operon organization involving the genes for chorismate synthase (aromatic biosynthesis pathway) and ribosomal GTPase center protein (*L11*, *L1*, *L10*, *L12*; *rplKJL*) in cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6803 // Ibid.—1993.—268, N 36.— P. 27447—27457.
12. Pettersson I. Studies on the RNA and protein binding sites of the *E. coli* ribosomal protein *L10* // Nucl. Acids Res.—1979.—6, N 7.— P. 2637—2646.
13. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Определение минимального сегмента рибосомного белка *L10* *E. coli*, сохраняющего регуляторную функцию // Докл. АН СССР.—1989.—309, № 2.— С. 493—496.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии  
НАН Украины, Киев

Получено 06.09.94