



УДК 577.21

© Е. Б. Патон, 1990

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КЛАСТЕРА *rplKAIL*

Данный обзор содержит разделы, посвященные эволюционному аспекту структурно-функциональной организации кластера генов *rplKAIL*, структурно-функциональной характеристике регуляторных рибосомных белков *L1* и *L10*, структуре лидерного участка мРНК *L10-L12*, содержащего сайт взаимодействия с регуляторным белком. Рассматриваются также особенности регуляции экспрессии генов *rplKAIL* на уровне трансляции и возможный механизм, обеспечивающий избыточный синтез белка *L7/L12 in vivo*. Приведены данные об особенностях конструирования рекомбинантных ДНК, содержащих гены *rplKAIL*, связанных с повышением дозы этих генов в клетке.

Гены кластера *rplKAIL*, кодирующие синтез рибосомных белков *L11*, *L1*, *L10* и *L7/L12*, расположены в *Rif*-области на 89-й минуте хромосомы *Escherichia coli* совместно с генами *rpoB* и *rpoC*, программирующими синтез β - и β' -субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы [1, 2]. По данным гибридизационного анализа [3], кластрирование генов *rplKAIL-rpoBC* является общей чертой для семи видов (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabile*) исследованных энтеробактерий. Показано, что аналогичный кластер указанные гены образуют и в геноме *Bacillus subtilis* [4]. В эволюционном аспекте большой интерес представили недавно полученные данные об организации генов, кодирующих аналоги белков *L11*, *L1*, *L10* и *L7/L12*, у археобактерии *Halobacterium cutirubrum* [5]. Как выяснилось, в геноме галобактерий сохраняется такой же характер кластрирования этих генов, что и у эубактерий. Другим, однако, оказался транскрипционный контроль. В отличие от присутствия трех основных видов транскриптов (мРНК: *L11-L1-L10-L12*, *L11-L1* и *L10-L12*) кластера *rplKAIL E. coli* у галобактерий обнаруживаются моноцистронный транскрипт *L11*, а также тетрацистронный транскрипт *L1-L10-L12*. Интересно наличие в нетранслируемом лидерном участке мРНК *L1 H. cutirubrum* района с последовательностью и структурой, почти идентичной участку связывания регуляторного рибосомного белка *L1* на 23S рРНК *E. coli*. Данный участок (мРНК *H. cutirubrum*) длиной 74 нуклеотида имеет большое сходство с лидерной последовательностью мРНК *L11-L1 E. coli*, принимающей участие в аутогенной регуляции трансляции этой мРНК. Известно, что у *E. coli* экспрессия генов в оперонах рибосомных белков регулируется на уровне трансляции единым для каждой полицистронной мРНК белком-регулятором. Для оперона *rplKA* им является белок *L1*, а для *rplJL* — *L10* или же комплекс его с *L7/L12* (форма *L8*). Неизвестно пока, регулируется ли синтез рибосомных белков археобактерий по такому же механизму. Различия в продуктах транскрипции генов кластера *rplKAIL E. coli* и *H. cutirubrum*, однако, дают основание полагать, что если такой механизм регуляции экспрессии и характерен для галобактерий, то регуляторные белки для генов *rplKAIL* у этих микроорганизмов отличны.

Для энтеробактерий характерна большая консервативность не только организации и регуляции самого кластера генов *rplKAIL-rpoBC*, но также и первичной структуры самих генов и кодируемых ими белков. Так, гомология с *E. coli* в структурной области генов

rplKA для *S. marcescens* и *P. vulgaris* составляет 89,2 и 80,9 % соответственно, а по аминокислотной последовательности кодируемых данными генами белков — 94,7 и 88,6 % [6]. Мы определили, что гомология с *E. coli* по нуклеотидной последовательности генов *rplJL* *S. typhimurium* составляет 98 и 96,7 % соответственно, по аминокислотной последовательности белков *L10* и *L7/L12* она равна 98,2 и 97,5 %. Более низкий процент гомологии с *E. coli* характерен для гена *rplL* и кодируемого им белка *L7/L12* *Pseudomonas putida* — 66 и 60 % соответственно [7].

С точки зрения эволюции, рибосомные белки *L10* из различных микроорганизмов можно разделить на две основные группы. Первую из них составляют белки *L10* архебактерий и эукариот, а вторую — эубактерий [8]. Эти группы отличны по трем параметрам: длина белковой цепи, сходство первичной и предполагаемой вторичной структуры. Такое же деление на две группы описано и для белков *L12* [9]. У архебактерий и эукариот белки *L10* и *L12* имеют сходные аминокислотные последовательности в С-концевых участках, хотя для каждого из белков наблюдаются большие отличия в пределах различных микроорганизмов. Это указывает на коэволюцию обоих белков: при изменении одного белка во втором также необходимы изменения, позволяющие сохранить полную функциональную активность. Поскольку в рибосомах эубактерий, архебактерий и эукариот белки *L10* и *L12* образуют комплекс, предположение об их коэволюции вполне логично. Оказывается, однако, что у эубактерий в отличие от архебактерий и эукариот не обнаруживается гомологии в С-концевом участке белков *L10* и *L12*. Постулируются [8] две причины коэволюции белков *L10* и *L12*: 1) для определенной функции в рибосомах необходима гомологичная первичная структура, 2) для образования комплекса белков *L10* и *L12* у архебактерий и эукариот в отличие от эубактерий необходима гомология С-концевых участков этих двух белков. Сравнительный анализ структуры рибосомных белков *L10* архебактерий (галобактерий и металококков), эубактерий и эукариот позволил сделать вывод о том, что с точки зрения эволюции белков *L10* и *L7/L12* архебактерии и эукариоты более близки между собой, чем каждое из царств с эубактериями [8].

Уровни регуляции экспрессии генов кластера *rplKAIL*. Изучению механизмов регуляции генов *Rif*-области хромосомы *E. coli* посвящено много экспериментальных работ и несколько детальных обзоров [1, 2].

К настоящему времени в результате применения различных экспериментальных подходов [10—13] достаточно полно изучен транскрипционный уровень контроля экспрессии генов *rplKAIL-rpoBC* *E. coli*. В инициации транскрипции принимают участие два сильных промотора P_{L11} и P_{L10} . Эффективность последнего на 30 % ниже, чем P_{L11} . Известно, что в присутствии вышележащего промотора P_{L11} P_{L10} не проявляет своей полной силы [1, 14]. Это получило название промоторной окклюзии. Помимо основных в данном кластере присутствуют минорные промоторы — P_{L12} , P_{β} и P_{β}' . Анализ продуктов транскрипции в *rplKAIL-rpoBC*-кластере *E. coli* с помощью S1-картирования [13] свидетельствует об отсутствии инициации транскрипции минорными промоторами в интактном кластере. В то же время клонирование этих промоторов в специальных векторах [10—12] указало на их способность иницировать транскрипцию, хотя и с очень низкой эффективностью. Сила P_{L12} , по данным [10], составляет 8 % эффективности P_{L10} . По нашим данным, полученным при клонировании P_{β} и P_{β}' в промотор-детекторную плазмиду *pJAC4*, сила обоих составляет примерно 4 % по сравнению с P_{L10} . В связи с 4-кратным избытком синтеза белка *L7/L12* *in vivo* возможность регуляции этого промотором P_{L12} представляла большой интерес [10—12]. Измерение эффективности P_{L12} [10, 11] и отсутствие самостоятельной инициаторной функции в интактном кластере [13] позволяют окончательно заключить, что P_{L12} не обеспечивает избыточного синтеза белка *L7/L12*. Таким образом, механизм промо-

торной окклюзии P_{L10} и роль минорных промоторов P_{L12} , P_{β} и P_{β}' в настоящее время не ясны.

Общий принцип «feedback»-регуляции оперонов рибосомных белков. Подобно другим оперонам рибосомных белков *E. coli* опероны *rplKA* и *rplJL* регулируются по принципу ауторепрессии трансляции полицистронных мРНК этих оперонов единым для каждого оперона белком-регулятором (*L1* — для оперона *rplKA* и *L10* или комплексом его с *L7/L12*, формой *L8*, — для оперона *rplJL*) [1, 2, 15, 16].

Впервые способность некоторых рибосомных белков репрессировать трансляцию кодирующих их мРНК была обнаружена около 10 лет

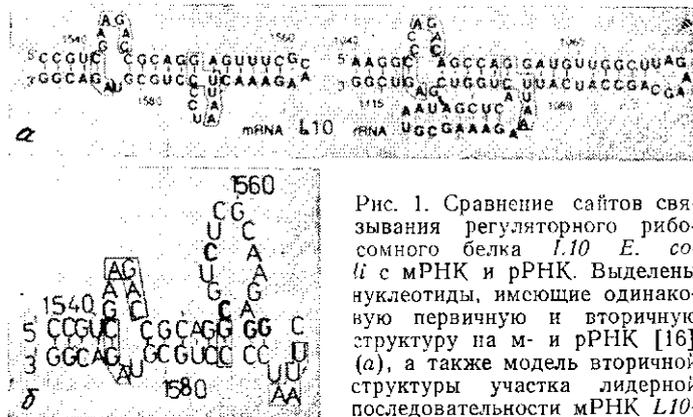


Рис. 1. Сравнение сайтов связывания регуляторного рибосомного белка *L10* *E. coli* с мРНК и рРНК. Выделены нуклеотиды, имеющие одинаковую первичную и вторичную структуру на м- и рРНК [16] (а), а также модель вторичной структуры участка лидерной последовательности мРНК *L10-L12* *S. typhimurium* и предполагаемый сайт связывания с регуляторным белком (б). Нумерация нуклеотидов соответствует [28]

лагасмый сайт связывания с регуляторным белком (б). Нумерация нуклеотидов соответствует [28]

Fig. 1. Comparison of mRNA and rRNA binding sites for the *E. coli* regulatory ribosomal protein *L10*. Boxes indicate nucleotides similar in primary and secondary structure between the mRNA and rRNA sites [16] (a). Model for the *S. typhimurium* *L10* binding domain on mRNA (b). Nucleotide numbering is according to [28]

назад [1, 2, 15]. Этот механизм регуляции основан на способности регуляторного белка конкурентно связываться с последовательностью-мишенью как на м-, так и на рРНК. В случае, когда синтез данного белка избыточен по отношению к синтезу рРНК, т. е. в клеточном пуле присутствует избыток свободного белка, он блокирует, связываясь с сайтом-мишенью на мРНК, трансляцию собственного и сопряженных с ним цистронов. Из известных регуляторных рибосомных белков [16] большинство специфически узнает единственный сайт на мРНК, находящийся обычно вблизи рибосомо-связывающего участка. К настоящему времени наиболее детально изучены структурные особенности регуляторных *p*-белков *L1*, *L10*, *S8* и *S4* и узнаваемых ими сайтов на м- и рРНК [16].

В отношении оперона *rplKA* экспериментально установлена способность белка *L1* связываться с участком 2120—2178 на рРНК и примерно 77—107 — на мРНК *L11-L1* [16]. Сравнительный анализ вторичной структуры этих участков позволил выявить сходные черты, обеспечивающие, по всей вероятности, белково-нуклеиновое взаимодействие.

Следовательно, можно предположить, что область мРНК, не захватывающая, однако, последовательности Шайна — Далгарно, непосредственно взаимодействует с *L1*. По-видимому, рибосомо-связывающий участок мРНК сближается с узнаваемой *L1* последовательностью в результате образования третичной структуры мРНК. На это указывает тот факт, что замена $C_{48} \rightarrow U$, находящегося вне узнаваемой *L1* последовательности, приводит к 7-кратному увеличению эффективности инициации трансляции [17].

В настоящее время нет однозначного ответа на вопрос, является ли регуляторным для *rplJL*-оперона *E. coli* собственно белок *L10* или его

комплекс с белком *L7/L12* — форма *L8*. Связывание с формой *L8* защищает от нуклеазного расщепления участок 23S рРНК 1033—1124 [16]. На мРНК участок связывания с регуляторным белком находится примерно 100 нуклеотидами выше рибосомо-связывающего сайта. Сайт связывания с *L8* подтвержден анализом с помощью защиты от нуклеазного расщепления и сайт-специфическим мутагенезом [18]. На рис. 1 показаны области, участвующие, по-видимому, во взаимодействии с *L8*. Охарактеризованы мутации вблизи сайта связывания с *L8*, влияющие на эффективность трансляции [18—21]. Предполагается, что увеличение эффективности трансляции в результате мутаций вблизи сайта связывания *L8* происходит в результате нарушения субструктуры мРНК, которая в норме снижает эффективность инициации трансляции *in vivo* [20]. Многочисленными экспериментами с использованием рекомбинантных плазмид, содержащих ген *rplJ*, продемонстрировано, что сверхэкспрессия белка *L10* летальна для клеток-хозяев или по крайней мере оказывает негативное влияние на жизнеспособность [20, 22—24]. Этот факт свидетельствует в пользу возможности осуществления регуляторной функции самим белком *L10*, а не только формой *L8*. Введение многокопийных плазмид, содержащих ген *rplL*, показало, что повышенный уровень синтеза в клетках *E. coli* белка *L7/L12* возможен и не сопровождается негативным эффектом [23, 25]. Следовательно, белок *L7/L12* не осуществляет самостоятельной регуляторной функции. Для количественной и сравнительной оценки регуляторной способности рекомбинантных и гетерологичных белков *L10* в клетки *E. coli* (содержащие мутацию *JF3029*, обеспечивающую возможность повышения в таких клетках уровня *L10* без негативного влияния на их жизнеспособность) вводили пары плазмид: одну из них использовали для экспрессии рекомбинантных и гетерологичных генов *rplJ*, другая же содержала детекторный ген *rplJ'-lacZ* с нативной полной лидерной последовательностью мРНК *L10-L12*. Известно [26], что в результате ауторепрессии синтез регуляторного рибосомного белка не прямо пропорционален увеличению количества кодирующей его мРНК. Поэтому в наших экспериментах необходимо было с учетом ауторепрессии обеспечить достаточное превосходство экспрессии генов *rplJ*, кодирующих продукцию белков *L10*, по отношению к детекторному гену *rplJ'-lacZ*. С этой целью для клонирования гена *rplJ'-lacZ* использовали плазмиду с более низкой копийностью, чем у плазмид-продуцентов *L10*. Кроме того, транскрипция гена *rplJ'-lacZ* обеспечивалась со слабого промотора P_4 по сравнению с промоторами P_{L10} и P_{lac} , иницирующими транскрипцию генов *rplJ*. Мы не отметили снижения уровня экспрессии репортерного гена даже под влиянием сверхпродукции нативного белка *L10*. Вполне вероятно, что в нашем случае отсутствие ожидаемого эффекта явилось результатом недостаточного перевеса экспрессии гена *rplJ* над детекторным, и вследствие ауторепрессии синтеза *L10* количества его не хватило для подавления экспрессии гена *rplJ'-lacZ*. В то же время мутации тестировали с использованием комплекса *L10* с *L7/L12* [18]. Форма *L8* была эффективной также и при защите связывания сайта взаимодействия с регуляторным белком на мРНК [18]. Логично предположить, что отсутствие ожидаемого эффекта в наших опытах могло быть связано и с более низкой регуляторной способностью белка *L10* по сравнению с комплексом его с димером *L7/L12*. Возможно, что большая эффективность формы *L8* определяется более прочным связыванием ее с мРНК.

Структурно-функциональные особенности регуляторных рибосомных белков *L1* и *L10*. Белок *L1* *E. coli* состоит из 233 аминокислотных остатков. В настоящее время неизвестно, являются ли N- и C-концевые домены *L1* необходимыми для осуществления регуляторной функции. Нет пока данных и об изучении структурно-функциональной топографии *L1* с помощью сайт-специфического мутагенеза. В то же время получена информация о возможности регуляции экспрессии генов

rplKA-оперона *E. coli* гетерологичными белками *L1* из *S. marcescens* и *P. vulgaris* [6]. Как уже отмечалось, степень гомологии этих белков с *E. coli* составляет 80,9 и 88,6 % соответственно.

Интересно, что *L1*-белок *E. coli* связывается с фрагментом 26S рРНК *Dictyostelium discoideum*, который гомологичен сайту связывания на рРНК *E. coli*.

Обнаружение возможности регуляции генов *rplKA E. coli* гетерологичными белками и определение первичной их структуры [27] позволяют выявить консервативные и вариабельные домены и исходя из этого — предположительную структурную организацию регуляторного рибосомного белка *L1*, обеспечивающую его взаимодействие с мРНК.

Рибосомный белок *L10 E. coli* состоит из 164 аминокислотных остатков [28]. Экспериментально показано, что делеция 20 С-концевых аминокислот сохраняет негативное влияние сверхэкспрессии этого белка на жизнеспособность клеток-хозяев [22—24]. Для изучения структурных основ взаимодействия *L10* с сайтом-мишенью РНК и, в частности, для разработки тактики сайт-специфического мутагенеза *L10* чрезвычайно важны данные о его пространственной организации. К сожалению, рентгеноструктурный анализ не дает пока достоверных результатов (А. Лильяс, личное сообщение). По некоторым данным (А. Лильяс, личное сообщение), в связывание с 23S рРНК вовлечен N-концевой участок *L10*, в то время как С-конец участвует в образовании комплекса *L10* с двумя димерами *L12*. Вторичная структура *L10*, исходя из знания первичной, предположительно такова (Б. В. Шестопапов, личное сообщение): 1—2 перегиб, 3—22 α -спираль, 23—28 β -структура, 29—31 перегиб, 32—34 β -структура, 35—37 перегиб, 38—40 β -структура, 41—46 перегиб, 47—64 α -спираль, 65—68 перегиб, 69—163 α -спираль, 164 перегиб.

Для определения минимального сегмента белка *L10*, достаточного для регуляторной функции, мы сконструировали серию рекомбинантных белков *L10* и тестировали эффект их сверхпродукции в клетках *E. coli* [23, 24]. Делеционный мутагенез показал, что максимальная делеция с С-конца *L10*, не приводящая к потере регуляторной функции, состоит из 20 аминокислотных остатков. Результатом увеличения этой делеции до 22 аминокислот явилась потеря регуляторной функции. Рекомбинантный белок *L10* с заменой двух N-концевых аминокислот обладает регуляторной функцией, которая утрачивалась при замене 11 N-концевых аминокислот. Критической оказалась замена Lys143 и Glu144 на Glp. Согласно предполагаемой вторичной структуре *L10* (Б. В. Шестопапов, личное сообщение), эта замена не приводит к изменению вторичной структуры *L10*. Можно, поэтому, полагать, что данные аминокислоты непосредственно вовлечены во взаимодействие *L10* с узнаваемой последовательностью мРНК. Альтернативным подходом к выявлению функционально значимых доменов *L10* может быть сравнение консервативных и вариабельных областей гетерологичных белков *L10* при возможности регуляции ими генов *rplJL E. coli*. Высокая консервативность организации кластера генов *rplKAIL* у энтеробактерий [3] и осуществление регуляции генов *rplKA*-оперона *E. coli* гетерологичными белками [6] делают очень вероятным наличие кросс-регуляции и в опероне *rplJL*. Клонирование нами гена *rplJ S. typhimurium* показало, что введение в клетки *E. coli* рекомбинантных плазмид, обеспечивающих высокий уровень его экспрессии, сказывается негативно на жизнеспособности клеток-хозяев. Аналогично гену *rplJ E. coli* мы наблюдали возможность клонирования гена *rplJ S. typhimurium* в плазмиде *pUC* в единственной ориентации, исключающей возможность увеличения экспрессии гена за счет промотора *lac*. О способности регулировать гены *rplJL E. coli* свидетельствовало и клонирование нами гена *rplJ* из *K. pneumoniae*. Определение и сравнение первичной структуры гена *rplJ S. typhimurium* с *E. coli* подтвердили их высокую гомологию (рис. 2). В аминокислотной последовательности *L10* наблюда-

ются лишь три замены: Ala62→Val, Pro67→Gln, Ala74→Thr, которые, следовательно, не сказываются на регуляторной функции *L10*.

Структурные особенности лидерного участка мРНК *L10-L7/L12*. Определение первичной структуры генов *rplKALJL-rpoBC E. coli* показало [28], что начало структурной области гена *rplJ* отделено от промотора P_{L10} 400 нуклеотидами лидерной последовательности. Экспериментальные данные, полученные с помощью изучения эффекта мутаций

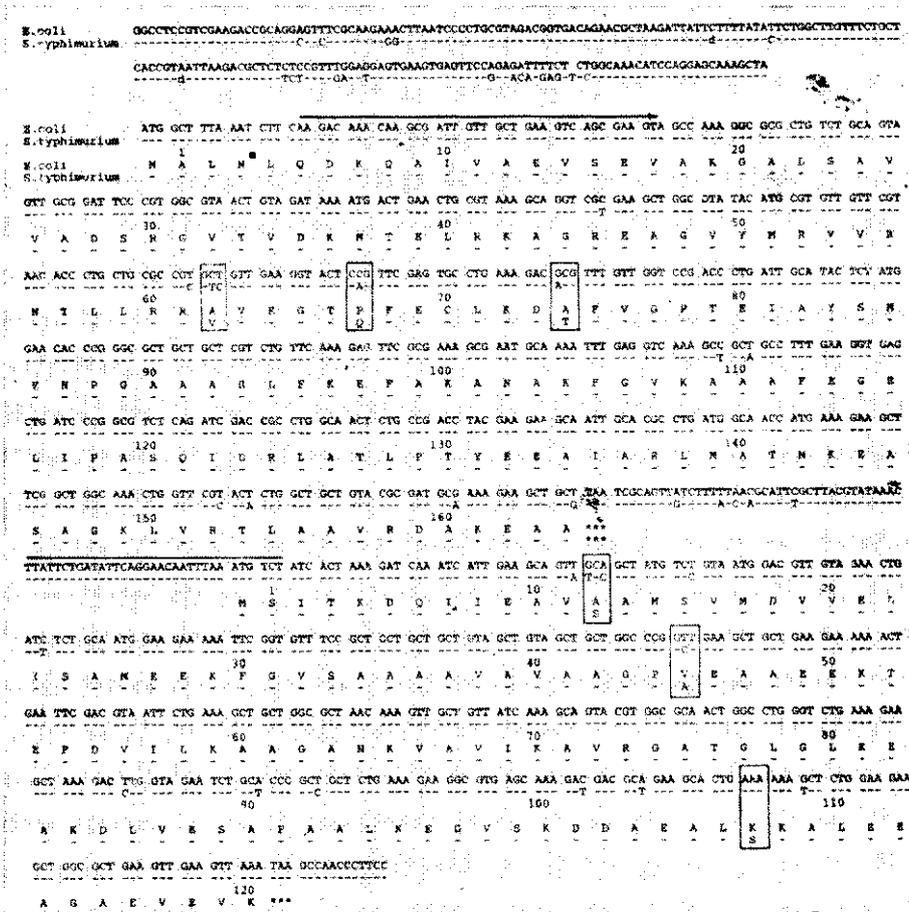


Рис. 2. Сравнение с *E. coli* определенной нами нуклеотидной последовательности фрагмента *rplJL*-оперона и дедуцированной аминокислотной последовательности белков *L10* и *L7/L12 S. typhimurium* [28]. Нумерация нуклеотидов соответствует *E. coli* [28]

Fig. 2. Comparison of the determined nucleotide sequence of the *S. typhimurium rplJL* operon fragment and the deduced amino acid sequence of proteins *L10* and *L7/L12* with *E. coli* [28]. Numbers of nucleotides correspond to *E. coli* [28]

[21] и химических модификаций [18], позволили предложить модель вторичной структуры этой области (рис. 3). Такая структурная организация обеспечивает существование трансляционно активной и заблокированной в результате связывания с регуляторным белком формы мРНК [21]. Возможно, связывание с белком *L10* или с его формой *L8* приводит к изменению вторичной структуры таким образом, что последовательность Шайна — Далгарно оказывается вовлеченной в спаривание, резко снижающее эффективность инициации трансляции [18, 21]. Анализ эффекта мутаций в лидерной последовательности мРНК [19] свидетельствовал о том, что критическое значение имели мутации нуклеотидов 1548 и 1634 (в соответствии с нумерацией [28]). Дальнейшее изучение эффекта мутаций и делеций в лидерной последовательности показало, что последовательность, необходимая для регуляции белком

L10, расположена на 80—200 нуклеотидов выше сайта инициации трансляции гена *rplJ* [21]. Было высказано предположение о том, что G1640 является частью сайта узнавания, но не сайта связывания с формой *L8*, а также частью участка, который, образуя спаривание с последовательностью вблизи рибосомо-связывающего сайта, ингибирует трансляцию мРНК. Последнее предположение основано на том, что мутация G1640, ослабляя предполагаемое спаривание, приводит к увеличению уровня

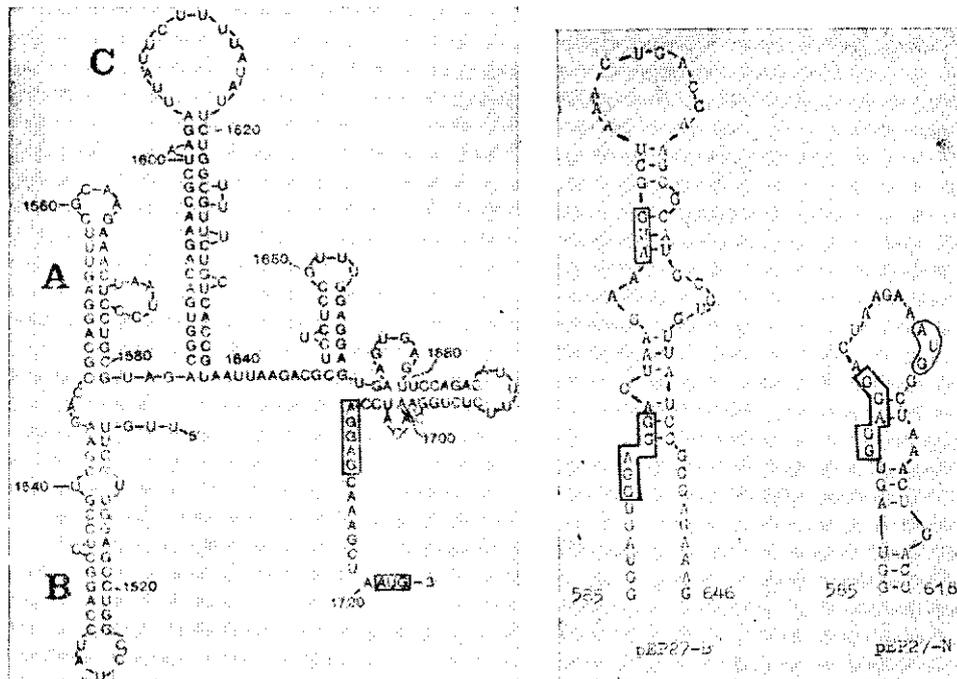


Рис. 3. Модель вторичной структуры участка лидерной последовательности мРНК *L10* по [21]. Нумерация нуклеотидов по [28]

Fig 3. Secondary structure model for the portion of the *L10* mRNA leader sequence proposed in [21]. Nucleotides numbers correspond to [28]

Рис. 4. Модели вторичной структуры мРНК для гена *rplA'-lacZ* при сохранении 3'-концевого фрагмента вышележащего гена *rplK* до сайтов узнавания *EcoRI*₂₈₀ (*pEP27-B*) и *NcoI*₅₇₅ (*pEP27-N*). Для конструирования гена *rplA'-lacZ* использованы сайты расщепления *BglIII* (*rplA*) и *BamHI* (*pUC18*). Показаны нуклеотиды последовательности Шайна — Далгарно и стартового кодона гена *rplA'-lacZ*

Fig. 4. Secondary mRNA structure models for the *rplA'-lacZ* gene, reserving the adjacent 3'-terminal portion of gene *rplK* up to the *EcoRI*₂₈₀ (*pEP27-B*) and *NcoI*₅₇₅ (*pEP27-N*) cleavage sites. The *BglIII* cleavage sites on *rplA* and *BamHI* site on *pUC18* were used for fusing *rplA* and *lacZ* genes. Nucleotides of the start codon and the Shine-Dalgarno sequence for *rplA'-lacZ* gene are indicated.

экспрессии гена. Последовательное получение мутаций и изучение их эффекта в лидерном участке мРНК *L10-L7/L12* подтвердило правильность предполагаемой структурной организации [18]. С помощью конструирования делеций, точечных замен и замен двух оснований, а также определения их влияния на регуляцию комплексом *L10-L7/L12* было экспериментально подтверждено, что участок связывания с регуляторным белком содержит шпильку [18]. Все мутации, приводящие к нарушению регуляции, локализованы в стебле шпильки 140 нуклеотидами выше сайта старта трансляции. Мутации, не нарушающие спаривания, не оказывали эффекта и на регуляцию трансляции. Учитывая данные по слиянию 5'-концевых фрагментов гена *rplJ* с геном *lacZ*, мы убедились в том, что сохранение участка 1522—1592 лидерной последовательности повышает уровень экспрессии гибридного гена *rplJ'-lacZ* [29]. В соответствии с вышеуказанной моделью вторичной структуры (рис. 3)

из-за удаления этой области исчезают шпильки А, В и нарушается шпилька С. Как предполагалось на основе изучения эффекта мутаций [2], ослабление спаривания в шпильках В и С не снижает эффективности связывания с комплексом *L10-L7/L12*. В то же время полная делеция шпилек А, В и С приводит к полному блокированию экспрессии, поскольку нарушение шпильки С, в свою очередь, меняет вторичную структуру мРНК аналогично переходу ее в результате связывания с регуляторным белком в трансляционно неактивную форму [21].

Осуществление регуляторной функции в клетках *E. coli* белком *L10 S. typhimurium* указывает на консервативность структуры последовательности-мишени на регулируемой мРНК. Определение нами первичной структуры лидерной последовательности мРНК *L10-L12 S. typhimurium* и сравнение ее с последовательностью *E. coli* (см. рис. 2) выявили некоторые отличия. На рис. 1 представлена построенная нами по методу [30] модель вторичной структуры мРНК *S. typhimurium* в участке взаимодействия с регуляторным белком. Как можно заметить, структура непосредственных сайтов связывания с регуляторным белком (включающая для *E. coli* нуклеотиды: C1541, GAC1544-1547, G1553, UUAА1569-1572 и AG1583-1584 [16]) аналогична у *S. typhimurium*. В то же время в силу изменяющихся замен вторичная структура всей области 1537—1588 отлична. Взаимозаменяемость белков *L10 E. coli* и *S. typhimurium* позволяет считать, тем не менее, что структурные особенности последовательности-мишени мРНК, обеспечивающие возможность взаимодействия ее с регуляторным белком, должны быть одинаковы у этих микроорганизмов.

Особенности трансляции в кластере *rplKAJL*. S1-картирование показало, что в кластере генов *rplKAJL* синтезируются полицистронные мРНК *L11-L1-L10-L12*, *L11-L1* и *L10-L12* [13]. Характерной является сопряженность трансляции дистального и проксимального цистронов в мРНК *L11-L1* и *L10-L12* [31, 32].

Существуют две принципиальные модели, объясняющие механизм сопряженной трансляции. Одна из них, применимая для оперона *rplKA*, допускает, что сопряженность трансляции цистронов обеспечивается за счет продолжения трансляции дистального цистрона (без реинициации) рибосомами или их компонентами, протранслировавшими проксимальный цистрон. Вторая модель сочлененной трансляции применима к оперону *rplJL*. Она предполагает, что независимая инициация трансляции дистального цистрона не происходит без трансляции проксимального цистрона в силу особенностей вторичной или третичной структуры мРНК.

При изучении механизма, обеспечивающего сопряженную трансляцию в опероне *rplKA E. coli*, Сор и соавт. [31, 42] исследовали влияние делеций в мРНК *L11-L1*, а также введение амбер-мутаций в проксимальный цистрон. Сохраняя лидерную последовательность впереди цистрона *L11*, 111, 45 и 21 нуклеотидом выше конца гена *rplK* вводили амбер-кодона. С увеличением расстояния от амбер-кодона до конца гена *rplK* прослеживалось снижение синтеза белка *L1*, кодируемого дистальным цистроном, по сравнению с *L11*. Когда стоп-кодон ввели 21 нуклеотидом выше конца гена *rplK*, цистрон *L1* стал транслироваться так же эффективно, как и в мРНК дикого типа. При изучении эффекта делеций в плазмиде *pNO2731* из лидерной последовательности мРНК *L11-L1* были удалены 92 нуклеотида, включая область Шайна — Далгарно для *L11*. В результате этого оказалась нарушенной экспрессия гена *rplA*. Далее делецию увеличивали до 466, 488 и 497 нуклеотидов. Последняя делеция сделала возможным невысокий уровень синтеза белка *L1*. Значительно увеличился уровень синтеза *L1* в результате расширения делеции до 500 нуклеотидов. Авторы не отметили структурных особенностей мРНК, которыми можно было бы объяснить сопряженность трансляции цистронов *L11* и *L1*. При конструировании рекомбинантных ДНК мы столкнулись со сниженной экспрессией встроеного в *pUC* гена *rplA* в случае наличия перед ним протяженного

3'-участка гена *rplK*. Исследуя функциональную топографию белка *L10* [24], мы наблюдали эффект однонаправленной, противоположной P_{lac} , ориентации фрагментов *rplJ*, кодирующих регуляторноспособный *L10*, при клонировании их в плазмиде *pUC*. В отличие от *rplJ* полный ген *rplA*, кодирующий *L1*, мог быть встроен в *pUC* под контроль индуцированного *lac*-промотора. Учитывая экспериментальные данные [31], мы сопоставили уровни экспрессии гена *rplA* (для чего провели его слияние с геном *lacZ'* в *pUC*) при делеции 3'-участка предшествующего гена *rplK*. Сравнение моделей вторичной структуры мРНК (рис. 4) по методу [30] показало, что делеция участка *L11* цистрона до сайта узнавания *NcoI* (23 нуклеотидами выше конца *L11*) приводит к изменению вторичной структуры мРНК в области инициации трансляции цистрона *L1* (рис. 4). Экспрессия гена *rplA'-lacZ'* в этом случае (*pEP27-N*) оказалась в 5 раз выше по сравнению с таковой этого же гена, но фланкированного 3'-областью *rplK* длиной 317 п. о. до сайта *EcoRI* (*pEP27-B*).

мРНК *L10-L12* отличается от мРНК *L11-L1* наличием протяженной межцистроной области, в которой расположена последовательность Шайна — Далгарно для гена *rplL* [28]. Петерсоном [32] предложена модель вторичной структуры мРНК *L10-L12*, объясняющая механизм сопряженной трансляции проксимального и дистального цистронов этой мРНК. Предполагается, что критическим элементом, обеспечивающим сопряженность трансляции обоих цистронов, является спаривание их 5'-концевых областей, которое, маскируя сайт инициации трансляции, препятствует независимой инициации трансляции дистального цистрона. В результате трансляции 5'-концевого участка цистрона *L10* происходит демаскировка сайта инициации трансляции дистального цистрона *L12*. В модели вторичной структуры мРНК *L10-L12*, предложенной Петерсоном [32], предполагается, что в спаривании участвуют области мРНК 1738—1773 (структурная последовательность *rplJ*) и 2256—2290 (часть интергенного пространства и начало структурной последовательности *rplL*). Предполагается также образование локальных субструктур. Для расплетания их необходимо, чтобы рибосомы протранслировали цистрон *L10* до конца, так как в противном случае он участвует в их формировании. В пользу наличия локальных субструктур в мРНК *L10-L12* свидетельствует и замеченное нами повышение экспрессии гена *rplL'-lacZ* при введении делеции $\Delta NruI-Eco105I$ в расположенный выше него участок *rplL*-оперона [29]. Мы предположили, что эффект делеции $\Delta NruI-Eco105I$ может объясняться особенностями структуры мРНК в сайте инициации трансляции цистрона *L12*. Из сравнения моделей вторичной структуры мРНК (рис. 5) следует, что при введении делеции $\Delta NruI-Eco105I$ изменение характера спаривания нуклеотидов рибосомо-связывающего участка *rplL* способствует снижению энергетических затрат при разрушении вторичной структуры в данной области. Следовательно, в результате такого изменения структуры мРНК инициация трансляции гена *rplL'-lacZ* должна стать более эффективной. Создание серии других делеций (*rplK10*, *rplK9*, *rplK8* и *rplK21*), описанных нами в [29], свидетельствует в пользу предполагаемой вторичной структуры мРНК, образуемой областью 2248—2288 (рис. 5).

Механизм регуляции неэквиволярного синтеза белков *L10* и *L7/L12*. Из всех рибосомных белков *E. coli* только *L7/L12* синтезируется в 4-кратном молярном избытке [2]. Слияние с геном *lacZ* 5'-концевых фрагментов *rplJ* и *rplL* показало, что с увеличением фрагмента *rplJ* в отличие от *rplL* экспрессия кодируемой гибридной β -галактозидазы снижается [29]. Данные S1-картирования [13] свидетельствуют против неодинаковой стабильности цистронов *L10* и *L7/L12* в бицистроной мРНК. Различий в стабильности мРНК, способных отразиться на уровне экспрессии *rplJ*, не замечено и в экспериментах [32]. Мы убедились в том, что меньший уровень экспрессии генов *rplJ'-lacZ* по сравнению с *rplL'-lacZ* не был связан с влиянием штамма-реципиента, копияности плазмид, а также с различной стабильностью гибридных

β -галактозидаз. Это дало нам основание предположить, что больший уровень экспрессии *rplL* может определяться большей эффективностью трансляции цистрона *L12*. Известен ряд факторов, определяющих эффективность трансляции. Эффективность сайта инициации трансляции обуславливается особенностями как первичной, так и вторичной структуры мРНК. В случае генов *rplJ* и *rplL* *E. coli* сравнение их сайтов инициации трансляции с консенсусом [33] не выявляет очевидных преимуществ *rplL*. Слияние с *lacZ* 5'-концевых фрагментов генов *rplJ* и

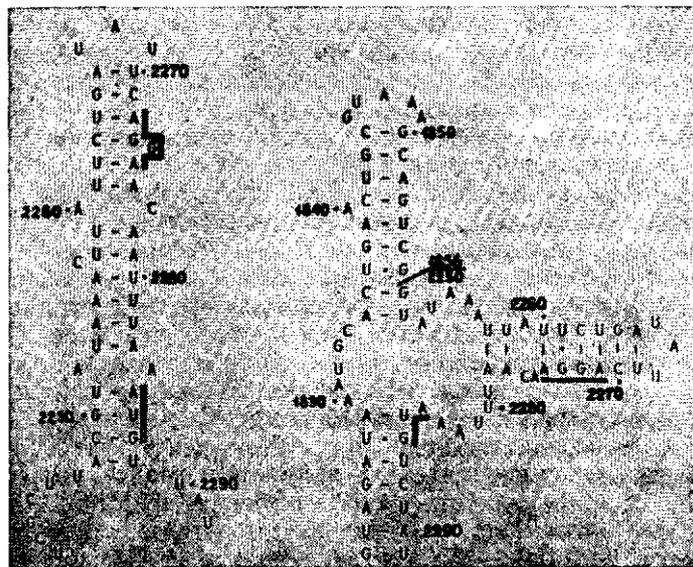


Рис. 5. Модели вторичной структуры интактной мРНК *L10-L12* (а) и содержащей делецию *NruI-Eco105I* (*SnaBI*) (б), повышающую экспрессию гена *rplL'-lacZ*. Показаны стартовый кодон и последовательность Шайна—Далгарно гена *rplL*. Нумерация нуклеотидов соответствует [28]

Fig. 5. Models of the secondary structure for the native mRNA *L10-L12* (a) and with *NruI-Eco105I* (*SnaBI*) deletion increasing the expression of gene *rplL'-lacZ*. The start codon and Shine-Dalgarno sequence of *rplL* gene are indicated. Nucleotide numbering is according to [28]

rplL величиной примерно 70 п. о. выявило 2-кратное превосходство экспрессии гена *rplL'-lacZ*. Возможно, что *in vivo* инициация трансляции цистрона *L12* более эффективна, чем *L10*. С увеличением сливаемых с *lacZ* фрагментов генов *rplJ* и *rplL* до примерно 260 п. о. уровень экспрессии *rplL'-lacZ* в 7 раз превысил *rplJ'-lacZ* [29]. Учитывая возможное влияние вторичной структуры мРНК на эффективность трансляции, мы проанализировали модели ее для указанных участков генов *rplJ* и *rplL*. Согласно таким моделям, рассчитанным на основе метода [30], структура мРНК в цистроне *L10* более стабильна, чем в *L12*. Разница значения ΔG для 260 5'-концевых нуклеотидов *rplJ* и *rplL* составила -30 ккал/моль.

Нам представлялось целесообразным проверить возможность регуляции неэквиволярного синтеза белков *L10* и *L7/L12 in vivo* и другими известными на сегодня механизмами. Так, в последнее время в литературе появляется все большее количество данных об участии природных антисмысловых РНК в регуляции экспрессии генов [34, 35]. Наличие такой РНК в опероне *rplJL* *E. coli* могло бы снижать уровень экспрессии гена *rplJ*. В экспериментах по котрансформации клеток *E. coli* парами плазмид, одна из которых продуцировала антисмысловую РНК к гену *rplJ*, а другая содержала репортерный ген *rplJ'-lacZ*, мы установили, что, действительно, антисмысловая РНК может ингибировать экспрессию гена *rplJ'-lacZ*. Эффективное ингибирование, однако, требовало большого (примерно 100-кратного) избытка антисмысловой РНК над

смысловой. Таким образом, в случае существования такого механизма регуляции в интактном опероне *E. coli* промотор, инициирующий антисмысловую РНК, должен был быть сравнимым по силе со «смысловым» промотором гена *rplJ-P_{L10}*. Мы провели поиск возможного антисмыслового промотора с помощью промотор-детекторной плазмиды *pJAC4* [36]. Антисмысловый промотор в опероне *rplJL E. coli* выявлен не был. Мы не обнаружили в опероне *rplJL Rep*-последовательности, а также и других особенностей, способных дифференцировать уровень экспрессии генов, транскрибируемых в виде полицистронной мРНК. Это дает основание считать, что различный уровень экспрессии генов *rplJL* связан с неодинаковой эффективностью трансляции соответствующих им цистронов в бицистронной мРНК. Более стабильная вторичная структура мРНК в цистроне *L10* обуславливает меньшую эффективность его трансляции по сравнению с цистроном *L12*, что и приводит к более низкому уровню экспрессии гена *rplJ* по сравнению с *rplJ in vivo*.

Изучение эффекта повышения дозы генов *rplKALJL*. Увеличение копиности генов в результате введения их в клетку в составе рекомбинантных плазмид позволяет наблюдать эффект «дозы генов». Применение этого подхода в случае генов, кодирующих синтез рибосомных белков оперона *rplJL E. coli*, позволило установить, что повышение дозы генов *rplJL* в клетке *E. coli* в 7—12 раз приводило к 6-кратному возрастанию количества соответствующей мРНК, но в то же время сопровождалось лишь 30 %-ным увеличением количества синтезирующихся белков [26]. Этот факт позволил опровергнуть существовавшее ранее представление о регуляции синтеза рибосомных белков на транскрипционном уровне и сделать заключение о регуляции их синтеза посттранскрипционно, т. е. на трансляционном уровне. Последующие эксперименты показали, что клонирование отдельных генов, а также полных соответствующих оперонов сопряжено с определенными сложностями и спецификой. Стало понятным, что увеличение в клетке уровня регуляторного рибосомного белка приводит к блоку трансляции транскрибируемой с генов хромосомы полицистронной мРНК оперона, регулируемого данным белком. Повышение количества в клетке регуляторного рибосомного белка, таким образом, помогает выявить другие гены, экспрессия которых контролируется данным белком. Кроме того, как оказалось, негативное влияние на жизнеспособность клеток-хозяев может иметь и повышение экспрессии генов полного оперона. Это может указывать на участие кодируемых данным опероном белков в регуляции экспрессии других генов или оперонов.

При попытке клонировать ген *rplJ* Фином и соавт. [20] было установлено, что данный ген под контролем собственного сильного промотора *P_{L10}* «неклонировем» в клетках *E. coli* в составе рекомбинантной плазмиды на основе *pBR322*. Соответствующие плазмиды обеспечивали летальный для клеток-хозяев уровень экспрессии *rplJ* и не могли поддерживаться в нормальных клетках-хозяевах. Для получения вышеуказанной плазмиды с геном *rplJ* авторы воспользовались полученной ими ранее плазмидой, содержавшей гены *rplA'JL-rpoB'* под контролем промотора *P_{L10}*. Единственный класс плазмид, полученный при попытке клонировать ген *rplJ* путем реконструкции вышеуказанной плазмиды, содержал оба гена — *rplJ* и *rplL*. Это свидетельствовало о взаимосвязи экспрессии генов *rplJ* и *rplL in vivo* и подтвердилось возможностью получения плазмиды, экспрессирующей ген *rplJ* в результате трансформации лигазной смесью клеток *E. coli*, уже содержащих рекомбинантную плазмиду, обеспечивающую экспрессию гена *rplJ*. Был сделан вывод о том, что белок *L10* является регуляторным, и при высоком уровне в клетке, обеспечиваемом наличием соответствующей рекомбинантной плазмиды, блокирует трансляцию мРНК, транскрибируемой с генов *rplJL* хромосомы. Установлено, подобно [26], что в результате введения в клетки рекомбинантной плазмиды на основе *pBR322* со встроенным геном *rplJ* количество соответствующей мРНК возрастало пропорционально дозе гена *rplJ*. В штамме, содержащем плазмиду *pNF1337*

(*pBR322* со встроенными генами *rplJL* под контролем P_{L10}), мРНК *L10-L12* накапливалась в 2,5-кратном избытке по сравнению с бесплазмидными клетками, в то время как прирост количества белков *L10* и *L7/L12* составил лишь 30 % в результате ауторепрессии трансляции мРНК белком *L10* или комплексом его с *L7/L12* [19].

Удивительной оказалась обнаруженная нами возможность клонирования гена *rplJ* с собственным промотором P_{L10} в плазмиде *pUC*, копияность которой примерно в 8 раз выше по сравнению с *pBR322* [37, 38]. Особенностью рекомбинантных плазмид на основе *pUC* при встраивании в них генов *rplJ* как *E. coli*, так и *S. typhimurium* оказалась однонаправленная (встречная индуцированному P_{lac}) ориентация вставки. Очевидно, что альтернативная ориентация как структурной области гена *rplJ*, так и фрагмента P_{L10} -*rplJ* обеспечивала летальный уровень экспрессии *rplJ* и невозможность поддержания таких плазмид в нормальных клетках-хозяевах *E. coli*. Мы предположили, что присутствие в рекомбинантных плаزمиде (на основе *pUC*), содержащих фрагменты P_{L10} -*rplJ* *E. coli* (*pEP20*) и *S. typhimurium* (*pMW12*), встречного направленного промотора *lac* оказывало положительный эффект в результате транскрипции с P_{lac} антисмысловой РНК, снижавшей уровень экспрессии гена *rplJ* [39]. Ингибирование экспрессии *rplJ*, тем не менее, было неполным и наличие в клетках *E. coli* плазмид *pEP20* и *pMW12* сказывалось отрицательно на их росте, хотя и в меньшей степени, чем в случае рекомбинантной плазмиды на основе *pBR322* с фрагментом P_{L10} -*rplJ* *E. coli*. Учитывая возможность клонирования гена *rplJ* с промотором P_{L10} в плазмиде *pUC* мы повторили описанную в литературе попытку встраивания этого фрагмента в плазмиду *pBR322* для сравнения эффекта, оказываемого такими плазмидами на клетки *E. coli*. Чтобы получить рекомбинантную плазмиду на основе *pBR322* с фрагментом P_{L10} -*rplJ* ДНК *E. coli*, мы использовали описанную нами ранее рекомбинантную плазмиду *pBR322/rpoB* [40], содержащую фрагмент *rplA'*- P_{L10} -*rplJL*-*rpoBC'*. После удаления участка *rplL'*-*rpoBC'* и самолигирования оставшейся части исходной плазмиды клетки *E. coli* трансформировали лигазной смесью и отбирали клоны, сохранившие устойчивость к ампициллину. Таким путем удалось получить рекомбинантные плазмиды, резко замедляющие рост клеток-хозяев. Эти клоны, однако, могли культивироваться не более одного ночного пассажа. В клонах, сохранивших нормальную жизнеспособность, целостность встроенного фрагмента ДНК нарушалась. Гибридизационный анализ подтвердил наличие в таких плазмиде лишь фрагментов исходной вставки, свидетельствуя о нарушении структуры гена *rplJ*. Сопоставляя влияние на жизнеспособность клеток *E. coli* полученных нами рекомбинантных плазмид, экспрессирующих ген *rplJ*, мы убедились в том, что плазмиды на основе *pUC* были менее токсичными. Замедляя рост клеток *E. coli*, они, тем не менее, могли поддерживаться в них на протяжении трех ночных пассажей.

Обнаружение мутантных клеток *E. coli* с изменениями в лидерной последовательности мРНК *L10-L7/L12*, «нечувствительных» к повышению уровня синтеза в клетке регуляторного белка *L10*, обеспечивало возможность применения их в качестве реципиентных для введения плазмид со встроенным геном *rplJ* [19]. Использование таких клеток *E. coli* *JF3029* (полученных нами из коллекции Дж. Фризена, Канада) снимало негативный эффект рекомбинантных плазмид на основе *pUC*, содержащих гены *rplJ* *E. coli* и *S. typhimurium*, транскрибируемые с собственного промотора P_{L10} в направлении, противоположном P_{lac} (*pEP20* и *pMW12*). С помощью клеток *JF3029* мы изучали возможность повышения в них уровня экспрессии гена *rplJ* по сравнению с обеспечиваемым *pEP20* и *pMW12*, т. е. возможность введения гена *rplJ* на плазмиде *pUC* при дополнительной транскрипции его с P_{lac} , что означает поддержание в клетках конструкций *pEP20-1* с геном *rplJ* *E. coli* (рис. 6) и аналогичной ей *pMW12-1* (с геном *rplJ* *S. typhimurium*). Для получения этих рекомбинантных плазмид лигазные смеси линейризован-

ной *pUC19* и *P_{L10}-rplJ*-фрагментов вводили в компетентные клетки *E. coli JF3029*. Это оказалось возможным в отличие от нормальных клонов *E. coli JM101*, в которых такие конструкции получены быть не могли. *pEP20-1* и *pMW12-1*, однако, резко замедляли рост клеток *JF3029* подобно эффекту, оказываемому на нормальные клетки *E. coli JM101* плазмидами *pEP20* и *pMW12*. В связи с наблюдаемым негативным влиянием *pEP20-1* и *pMW12-1* интересно было бы оценить фактическое увеличение экспрессии клонированного в них гена *rplJ* по сравнению с *pEP20* и *pMW12*. Негативное влияние, оказываемое присутствием *pEP20-1* и *pMW12-1* на жизнеспособность даже мутантных клеток *E. coli*, делает невозможным измерение уровня синтеза в них белков *L10*. Как показало сравнение эффективности *P_{L10}* и *P_{lac}* с помощью промотор-детекторной плазмиды, соотношение их силы равно 1,5 : 1 [10]. Оказалось, однако, что при последовательном расположении (рис. 7) эффективность *P_{L10}* ниже, чем индуцированного *P_{lac}*. Конструирование модельного гена *rplJ'-lacZ'*

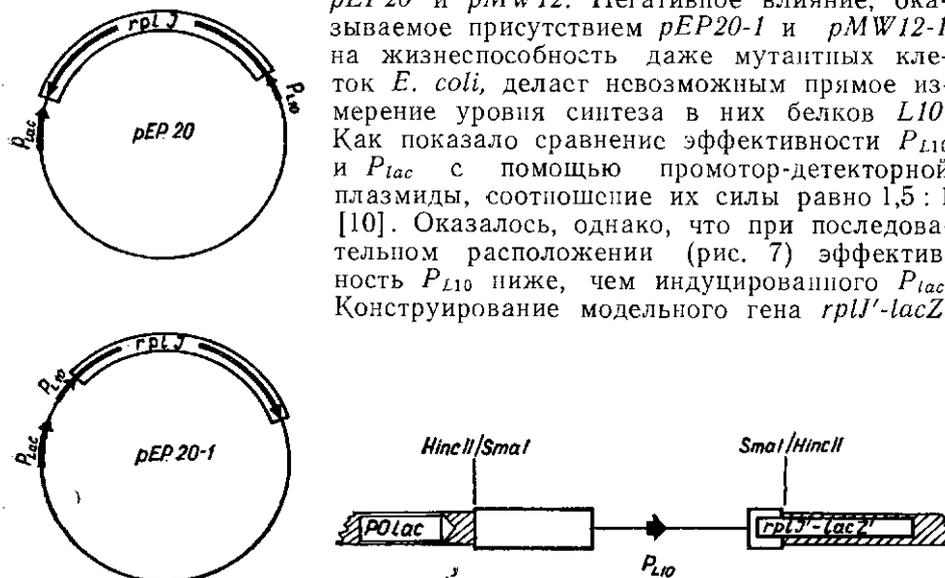


Рис. 6. Схема рекомбинантных плазмид на основе *pUC19*, содержащих *EcoRI*-фрагмент с промотором *P_{L10}* и геном *rplJ* *E. coli* в альтернативных ориентациях. Аналогичные конструкции *pMW12* и *pMW12-1*, описанные в тексте, содержали *P_{L10}-rplJ*-фрагмент ДНК *S. typhimurium*

Fig. 6. Schematic presentation of *pUC19*-based recombinant plasmids, containing the *EcoRI* fragment with *E. coli P_{L10}* and *rplJ* in the alternative orientations. Analogous plasmids *pMW12* and *pMW12-1*, containing *P_{L10}-rplJ* fragment of *S. typhimurium* DNA are described in the text

Рис. 7. Модельный ген *rplJ'-lacZ* в плазмидах *pUC18* (*pEP31*) и *pUC19* (*pEP32*), транскрибируемый с последовательно расположенных промоторов *lac* и *P_{L10}*. Конструирование гена описано в [24]. Указана активность β-галактозидазы, обеспечиваемая экспрессией гена *rplJ'-lacZ* при индукции *lac*-промотора ИПТГ и без нее

Fig. 7. Model gene *rplJ'-lacZ* carried by plasmids *pEP31* (based on *pUC18*) and *pEP32* (based on *pUC19*) and transcribed from the consequent *lac* and *P_{L10}* promoters. Recombinant DNA construction is described in [24]. β-galactosidase activity, provided by *rplJ'-lacZ* gene expression by the IPTG induced and repressed *lac* promoter, is indicated

в плазмидах *pUC* [24] свидетельствует о том, что уровень активности гибридной β-галактозидазы, кодируемой геном *rplJ'-lacZ'*, транскрипция которого иницируется неиндуцированным *P_{lac}* и *P_{L10}*, составляет 12,5 и 37,5 ед. Миллера (для *pUC18* и *pUC19* соответственно). В результате индукции *P_{lac}* ИПТГ уровень экспрессии гибридного гена возрастает до 222 и 335 ед. Миллера соответственно.

Интересен сильный негативный эффект увеличения экспрессии гена *rplJ* для мутантных клеток *JF3029*. Мутация *JF3029* не охарактеризована и, возможно, приводит не к полной потере, а лишь к снижению сродства *L10* и узнаваемой им последовательностью на мРНК. Именно с этим может быть связано резко отрицательное влияние на клетки *JF3029* повышенного уровня экспрессии гена *rplJ*. Важно, что эффект этот одинаков для генов *rplJ* как *E. coli*, так и *S. typhimurium*. С учетом ауторепрессии синтеза белка *L10* с мультикопийной плазмиды можно полагать, что экспрессия гена *rplJ* с *pEP20-1* и *pMW12-1* не прямо пропорциональна увеличению эффективности транскрипции.

Возможно, поэтому, что прирост продукции белка *L10* при дополнительной транскрипции гена *rplJ* с промотора *lac* не был значительным. Нужно отметить, что резко отрицательное влияние на жизнеспособность клеток-хозяев *E. coli* наблюдалось и при незначительном увеличении продукции в них регуляторного рибосомного белка *S4* (Д. Дрейпер, личное сообщение).

Конструирование рекомбинантных плазмид и гибридных генов позволяет провести ориентировочную корреляцию между летальным, токсичными и допустимым для клеток-хозяев уровнем экспрессии встроенного в *pUC* гена *lacZ*. Летальный уровень, который обеспечивается при последовательной транскрипции встроенного гена *rplJ* с промоторов P_{lac} (даже неиндуцированного) и P_{L10} , с учетом ауторепрессии был бы ниже, чем у модельного (12,5 ед. Миллера, *pEP31* [24]). Представление о допустимой дозе экспрессии гена *rplJ* дает клонирование его в плазмиде *pUC* под контролем неиндуцированного *lac*-промотора. Оказалось, что при таком встраивании гена *rplJ* содержащие его рекомбинантные плазмиды (*pEP8-1*) не оказывали негативного влияния на жизнеспособность нормальных клеток *E. coli* и стабильно поддерживались в них. Уровень экспрессии гибридного гена *rplL'-lacZ'* (обеспечившего *Lac*⁺-фенотип, по которому проводили отбор рекомбинантных клонов) составил около 1 ед. Миллера. Учитывая 4-кратный молярный избыток синтеза белка *L7/L12* по сравнению с *L10*, экспрессия гена *rplJ* была, следовательно, ниже, чем у *rplL'-lacZ'*.

Клонирование фрагмента, содержащего гены *rplJ* и *rplL* *E. coli* в плаزمиды *pHSG415* [41] и *pBR322*, количество копий которых в клетке соответственно 5—8 и 19—26, не сопровождалось негативным влиянием на жизнеспособность клеток-хозяев. Полученные рекомбинантные плазмиды были стабильными и поддерживались в клетке в ходе продолжительного культивирования [40]. Эксперименты Фиила и соавт. [20] также свидетельствовали о том, что увеличение дозы генов *rplJ* и *rplL* в клетках *E. coli* в результате совместного поддержания в них плазмид, содержащих эти гены, не отражается на жизнеспособности клеток-хозяев *E. coli*. Весьма интересно, что клонирование в плазмиде — производной *pBR322* фрагмента *rplA'-P_{L10}-rplJL-rpoBC'* ДНК *S. typhimurium* сопровождалось нестабильностью полученной конструкции *pNL1*, препятствовавшей получению плазмиды в препаративных количествах [42]. При поддержании *pNL1* в мутантном хозяине (*E. coli* *JF3029*) плазмида оказалась стабильной.

Более высокий уровень экспрессии генов *rplJL* *E. coli* (по сравнению с уровнем, обеспечиваемым клонированием в *pBR322*) создавал условия для введения их в клетку в составе рекомбинантной плазмиды *pUC*. Копийность *pUC* в 7,5 раз превосходит *pBR322*. Помимо этого использование для клонирования *pUC* позволяло нам изучить возможность и эффект еще большего увеличения уровня экспрессии генов *rplJL* за счет транскрипции с промотора *lac* в случае соответствующей ориентации встроенных генов. При клонировании фрагмента *rplA'-P_{L10}-rplJL-rpoBC'* ДНК *E. coli* в плазмиде *pUC19* мы обнаружили, что во всех полученных при селекции путем индуцирования P_{lac} рекомбинантных плаزمиды встроенный фрагмент имел одинаковую, противоположную P_{lac} , ориентацию [43]. Логично предположить, что отсутствие альтернативной ориентации явилось следствием летального уровня экспрессии встроенных генов *rplJL*, который достигался за счет транскрипции их дополнительно с P_{lac} помимо собственного промотора P_{L10} . По аналогии с клонированием гена *rplJ*, мы полагали, что и в данном случае конвергентная транскрипция встроенных генов с P_{lac} вектора, вероятно, снижает продукцию белков *L10* и *L7/L12*, кодируемых встроенными генами *rplJL*. Клонирование этого же фрагмента ДНК в плазмиду *pUC* с удаленным промотором *lac* оказалось невозможным, подтверждая, что наличие встречно направленного P_{lac} действительно создавало возможность клонирования генов *rplJL* в плаз-

миде *pUC*. Можно допустить, что конвергентная транскрипция с *P_{lac}* снижала уровень продукции белков оперона *L10* и *L7/L12*. Кроме того, невозможность клонирования полного оперона *rplJL* в плазмиде с удаленным *lac*-промотором показала, что 7,5-кратное увеличение дозы генов *rplJL* (обусловленное большей копийностью *pUC* по сравнению с *pBR322*, в которой клонирование генов *rplJL* не сопровождалось отрицательным для клеток-хозяев эффектом) летально для клеток-хозяев. В пользу негативного влияния повышения в клетках *E. coli* экспрессии

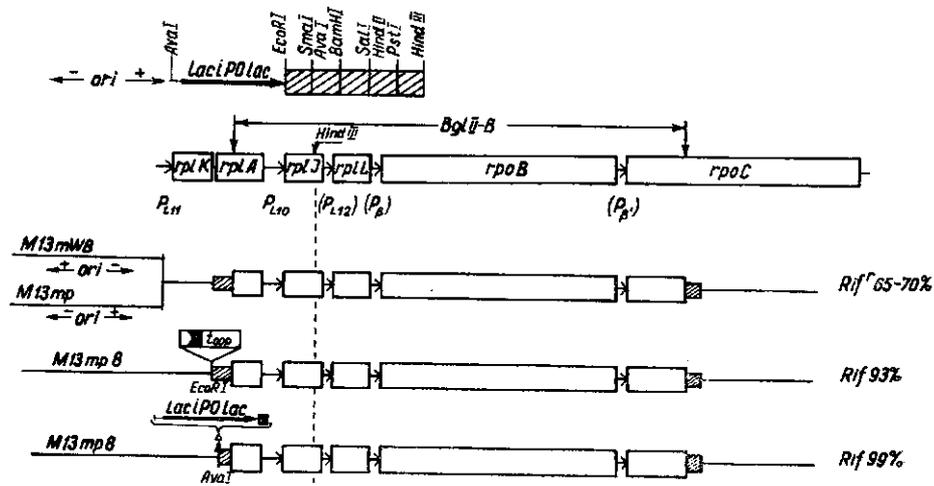


Рис. 8. Схема конструирования рекомбинантных фагов на основе *M13*, содержащих фрагмент *rplA'-P_{L10}-rplJL, rpoBC'* ДНК *E. coli*. В процентах указана стабильность фагов, определенная по сохранности *Rif^R* фенотипа, обеспечиваемого мутацией в гене *rpoB*
 Fig. 8. Schematic presentation of recombinant phages constructed by cloning of the *E. coli rplA'-P_{L10}-rplJL, rpoBC'* DNA fragment in *M13* filamentous phage. Percentage corresponds to the stability of the recombinant phages, determined by preservation of *Rif^R* phenotype provided by mutant *rpoB* gene.

генов полного оперона *rplJL* свидетельствуют и особенности клонирования этих генов в фагах *M13*. Клонирование фрагмента, содержащего *P_{L10}-rplJL-rpoBC'* ДНК *E. coli* в фагах *M13* (копийность которых в клетке может достигать 200 [44]), сопровождалось нестабильностью рекомбинантных фагов и однонаправленной ориентацией в них ДНК-вставки. В данном случае ориентация встроенного фрагмента была такой, что направление транскрипции с *P_{lac}* и *P_{L10}* совпадало (рис. 6) [45—47]. Мы предположили, что отсутствие альтернативной ориентации вставки в рекомбинантных фагах связано с нарушением репликации фагов в результате транскрипции со встроенного промотора *P_{L10}* в область точки начала репликации. Стабильность рекомбинантных фагов удалось значительно повысить при снижении транскрипции, а следовательно, и экспрессии встроенных генов за счет делеции промотора *lac* в векторе и встраивания между *P_{lac}* и *P_{L10}* терминатора транскрипции оор-РНК фага лямбда и *t_{β'}* из *rplJL-rpoBC* оперона *E. coli* (рис. 8) [46, 47]. Низкая стабильность рекомбинантных молекул и, в частности, рекомбинантных фагов на основе *M13* может быть связана с разными факторами. Оптимальным размером ДНК-вставки для фагов *M13* является примерно 1000 п. о., клонирование большего фрагмента может сопровождаться нестабильностью [44]. При клонировании в фагах *M13* других фрагментов ДНК, равных по размерам фрагменту *P_{L10}-rplJL-rpoBC*, мы не наблюдали нестабильности. Кроме того, стабильность фагов, содержащих гены *rplJL*, удавалось значительно повысить при тех же размерах вставки путем снижения экспрессии встроенных генов. Эти факты позволяют считать, что нестабильность в случае клонирования генов *rplJL* обуславливалась негативным для

клеток-хозяев увеличением уровня синтеза в них белков, кодируемых генами полного оперона *rplJL*.

Клонирование генов оперона *rplKA* *E. coli* также указало на существование определенного допустимого для жизнеспособности клеток уровня синтеза белков *L11* и *L1*. При встраивании фрагмента P_{L11} -*rplKA* в плазмиду *pUC* мы увидели, что, как и в случае генов оперона *rplJL*, все рекомбинантные плазмиды содержат вставку в единственной, противоположной P_{lac} , ориентации [23]. Можно, следовательно, заключить, что при альтернативной ориентации вставки уровень экспрессии генов *rplKA*, обеспечиваемый их транскрипцией с P_{lac} и P_{L11} , оказался летальным, что обусловило невозможность поддержания таких плазмид в клетках *E. coli*. Учитывая кластерную организацию генов *rplKAIL*, можно было допустить существование координированной экспрессии генов оперонов *rplKA* и *rplJL*, которая нарушалась в результате высокого уровня экспрессии генов каждого из этих оперонов. Исходя из этого мы считали, что увеличение копияности всех четырех генов *rplKAIL* будет возможным. В высококопийной плазмиде *pUC*, однако, клонировать фрагмент P_{L11} -*rplKA*- P_{L10} -*rplJL* не удалось [23]. Для изучения возможности менее значительного повышения дозы этих генов мы попытались встроить содержащий их фрагмент ДНК в низкокопийную плазмиду *pHSG415* (копияность ее приблизительно в 3 раза ниже, чем *pBR322*). Однако даже в этой плазмиде фрагмент, содержащий гены P_{L11} -*rplKA*- P_{L10} -*rplJL*, клонировать не удалось, следовательно, и этот уровень синтеза белков *L11*, *L1*, *L10* и *L7/L12* оказался летальным для клеток *E. coli*. По сообщению [22], летальна была и плаزمида на основе *pBR322*, содержащая P_{L11} -*rplKA*- P_{L10} -*rplJ'*-фрагмент ДНК *E. coli*. Авторы заключили, что летальный эффект присутствия в клетках такой рекомбинантной плазмиды связан с высоким уровнем транскрипции гена *rplJ* (в котором делеция 20 С-концевых аминокислот не нарушала регуляторной способности синтезирующегося рибосомного белка *L10*), обеспечиваемым P_{L11} и P_{L10} . Вполне вероятно, в связи с невозможностью повышения дозы генов *rplKAIL*, что причиной летальности этой плазмиды был высокий уровень экспрессии всех клонированных генов. Интересно, что летальны для клеток *E. coli* и плазмиды, содержащие полный *S4*-оперон *E. coli* (Д. Дрейнер, личное сообщение), регулируемый рибосомным белком *S4*. Одним из объяснений летальности высокого уровня экспрессии генов полных оперонов рибосомных белков может быть участие кодируемых ими продуктов в регуляции экспрессии других генов/оперонов *E. coli*, которое нарушается при увеличении дозы.

В заключение следует отметить, что, несмотря на большое количество проведенных исследований, некоторые аспекты и особенности механизмов регуляции экспрессии генов *rplKAIL* пока выяснены не полностью и представляют интерес для последующего анализа. В плане изучения структурно-функциональных основ взаимодействия белков-регуляторов (*L1* и *L10*) с последовательностью на мРНК целесообразно исследование как гетерологичных, так и мутантных белков. Этот подход позволит выявить консервативные и переменные домены и установить участки, необходимые для взаимодействия с регулируемой мРНК. Интересным будет и сравнение гетерологичных последовательностей-мишеней мРНК, которые регулируются одним и тем же белком.

В плане особенностей трансляции мРНК *L11-L1* и *L10-L12* представляется необходимым выяснение пространственной организации полной мРНК и возможных ее изменений за счет локальных субструктур.

Неясным пока является механизм окклюзии промотора P_{L10} в интактном кластере *rplKAIL*. Интересно было бы исследовать принципиальную возможность влияния на эффективность P_{L10} окружающих его последовательностей.

Учитывая все полученные до сих пор данные, наиболее вероятной кажется регуляция неэквиволярного синтеза белков *L10* и *L7/L12* в *rplJL*-опероне на уровне трансляции. Вполне возможно, однако, наличие в этом опероне и какого-то другого, неизвестного пока механизма регуляции.

С точки зрения изучения «эффекта дозы» гена *rplJ* важным было бы установление и сравнение точной концентрации в клетке белка *L10* при разной степени негативного влияния на жизнеспособность нормальных клеток *E. coli*. Возможность сопоставления эффекта повышения дозы генов, кодирующих регуляторные рибосомные белки, в разных мутантных клетках позволила бы подтвердить или внести коррективы в предполагаемую структуру последовательности-мишени мРНК.

Обнаруженное ограниченное повышение дозы полных оперонов *rplKA* и *rplJL* и летальный эффект даже очень незначительного увеличения ее для генов *rplKAJL* предположительно связано с нарушением в результате этого других регуляторных звеньев в клетке *E. coli*. Если это действительно так, то выяснение генов/оперонов, коррегируемых с данными, представит очень большой интерес для цельной картины регуляции биосинтеза рибосомных белков в клетке.

Изучение механизмов регуляции экспрессии генов *rplKAJL* и использование данных генов в качестве модельных может быть существенным и для прикладных исследований. Выяснение связанных с этим закономерностей может дать новую информацию о факторах, необходимых для оптимизации экспрессии клонируемых генов. Возможность клонирования гена *rplJ* в высококопийной плазмиде *pUC* при наличии конвергентной транскрипции встроенного фрагмента с промотора *P_{lac}* свидетельствует о том, что такой эффект может быть использован и в случае клонирования других генов, продукты которых токсичны для клеток-хозяев. В аспекте биотехнологии интересным может быть пример повышения стабильности рекомбинантных фагов в результате снижения экспрессии встроенных генов *rplJL*.

PECULIARTIES OF EXPRESSION REGULATION OF THE *rplKAJL* GENE CLUSTER

E. B. Paton

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The review is focused on the evolutionary point of structure and functional organization of the *rplKAJL* gene cluster, characteristics of the *L1* and *L10* regulatory ribosomal proteins and structural features of the *L10-L7/L12* mRNA leader sequence, which contains a *L10* binding site. The principles and specific features of the translational control of *rplKAJL* genes expression are considered and the regulatory mechanism, providing for the excess synthesis of *L7/L12* protein in vivo is proposed. Peculiarities of recombinant molecules, caused by elevation of the cloned *rplKAJL* gene dosage in the cell, are discussed as well.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jinks-Robertson S., Nomura M. Ribosomes and tRNA // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* molecular and cellular biology.— New York: Amer. Soc. Microbiol., 1987.— P. 1358—1385.
2. Lindahl L., Zengel J. M. Ribosomal genes in *Escherichia coli* // *Ann. Rev. Genet.*— 1986 — 20.— P. 297—326.
3. Tittawella I. P. B. Evidence for clustering of RNA polymerase and ribosomal protein genes in six species of *Enterobacteria* // *Mol. and Gen. Genet.*— 1984.— 195, N 1.— P. 215—218.
4. Dabbs E. R. Order of ribosomal protein genes in the Rif cluster of *Bacillus subtilis* is identical to that of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*— 1984.— 159, N 2.— P. 770—772.

5. Shimmin L. C., Dennis P. P. Characterization of the *L11*, *L1*, *L10* and *L12* equivalent ribosomal protein gene cluster of the halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum* // EMBO J.—1989.— 8, N 4.— P. 1225—1235.
6. Sor F., Nomura M. Cloning and DNA sequence determination of the *L11* ribosomal protein operon of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris*: translational feedback regulation of the *Escherichia coli* *L11* operon by heterologous *L1* proteins // Mol. and Gen. Genet.—1987.— 210, N 1.— P. 52—59.
7. Бородин А. М., Данилкович А. В., Алликметс Р. Л. Нуклеотидная последовательность гена *rplL*, кодирующего рибосомный белок *L7/L12 Pseudomonas putida* // Биол. химия.—1989.— 15, № 4.— С. 560—561.
8. Köpke A. K. E., Baier G., Wittmann-Liebold B. An archaeobacterial gene from *Methanococcus vannielii* encoding a protein homologous to the ribosomal protein *L10* family // FEBS Lett.—1989.— 247, N 2.— P. 167—172.
9. Primary structure of the archaeobacterial *Methanococcus vinnielii* ribosomal protein *L12*. Amino acid sequence determination, oligonucleotide hybridization, and sequencing of the gene / O. Strobel, A. K. E. Köpke, R. M. Kamp et al. // J. Biol. Chem.—1988.— 263, N 14.— P. 6538—6546.
10. Ralling G., Linn T. Relative activities of the transcriptional regulatory sites in the *rplKAIL-rpoBC* gene cluster of *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1984.— 158, N 1.— P. 279—285.
11. An G., Friesen J. D. Characterization of promoter-cloning plasmids: analysis of operon structure in the *rij* region of *Escherichia coli* and isolation of an enhanced internal promoter mutant // Ibid.—1980.— 144, N 3.— P. 904—916.
12. Barry G., Squires C. L., Squires C. Control features within the *rplIL-rpoBC* transcriptional unit of *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.— 76, N 10.— P. 4922—4926.
13. Downing W. D., Dennis P. P. Transcription products from the *rplKAIL-rpoBC* gene cluster // J. Mol. Biol.—1987.— 194, N 4.— P. 609—620.
14. Morgan B., Hayward R. S. S1 analysis of *P_{L10}* activity in the *E. coli* *rpoBC* operon after aminoacyl-tRNA limitation or rifampicin treatment // Sequence specificity in transcription and translation.— New York: Alan R. Liss, 1985.— P. 31—40.
15. Nomura M., Gourse R., Baughman G. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components // Ann. Rev. Biochem.—1984.— 53.— P. 75—118.
16. Draper D. E. How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autogenously regulated ribosomal proteins // Trends Biochem. Sci.—1989.— 14, N 8.— P. 335—338.
17. Thomas M. S., Nomura M. Translational regulation of the *L11* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: mutations that define the target site for repression by *L1* // Nucl. Acids Res.—1987.— 15, N 7.— P. 3085—3095.
18. Climie S. C., Friesen J. D. Feedback regulation of the *rplIL-rpoBC* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure // J. Mol. Biol.—1987.— 198, N 3.— P. 371—381.
19. Friesen J. D., Tropak M., An G. Mutations in the *rplJ* leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // Cell.—1983.— 32, N 2.— P. 361—369.
20. Post-transcriptional regulatory mutants in ribosomal protein-RNA polymerase operon of *E. coli* / N. Fiil, J. D. Friesen, W. L. Downing, P. P. Dennis // Ibid.—1980.— 19, N 3.— P. 837—844.
21. RNA secondary structure and translation inhibition: analysis of mutants in the *rplJ* leader / T. Christensen, M. Johnsen, N. P. Fiil, J. D. Friesen // EMBO J.—1984.— 3, N 7.— P. 1609—1612.
22. Friesen J. D., An G. The lethal effect of a plasmid resulting from transcriptional readthrough or *rplJ* from the *rplKA* operon in *Escherichia coli* // Mol. and Gen. Genet.—1983.— 189, N 2.— P. 275—281.
23. Патон Е. В., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Однонаправленная ориентация при клонировании фрагментов *rplKAIL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в многокопийной плазмиде *pUC* // Биополимеры и клетка.—1989.— 5, № 1.— С. 58—66.
24. Патон Е. В., 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.
25. Использование многокопийной плазмиды *pUC19* для обеспечения конститутивной экспрессии гена *rplL Escherichia coli* / С. Б. Золотухин, А. Н. Живолуп, И. В. Крупская и др. // Цитология и генетика.—1989.— 23, № 6.— С. 22—24.
26. Dennis P. P., Fiil N. P. Transcriptional and posttranscriptional control of RNA polymerase and *r*-protein genes cloned on composite *ColE1* plasmids // J. Biol. Chem.—1979.— 254, N 15.— P. 7540—7547.
27. Specific binding of prokaryotic ribosomal protein to a eukaryotic ribosomal RNA: implication for evolution and autoregulation / R. L. Gourse, D. L. Thurlow, S. A. Gerbi, R. A. Zimmerman // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.— 78.— P. 2722—2726.
28. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit β in *Escherichia coli* / L. E. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura et al. // Ibid.—1979.— 76.— P. 1697—1701.
29. Крупская И. В., Живолуп А. Н., Патон Е. В. Конструирование гибридных генов *lacZ* для изучения механизмов регуляции экспрессии генов *rplIL*-оперона *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—1990.— 6, № 2.— С. 91—100.
30. Zuker M., Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information // Nucl. Acids Res.—1981.— 9, N 1.— P. 133—148.

31. Sor F., Bolotin-Fukuhara M., Nomura M. Mutational alterations of transcriptional coupling in the *L11* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* // J. Bacteriol.— 1987.— 169, N 8.— P. 3495—3507.
32. Petersen C. Long-range translational coupling in the *rplJL-rpoBC* operon of *Escherichia coli* // J. Mol. Biol.— 1989.— 206.— P. 323—332.
33. Gold L., Stormo G. Translation initiation // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* molecular and cellular biology.— New York: Amer. Soc. Microbiol., 1987.— V. 2.— P. 1302—1307.
34. Inouye M. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation — a review // Gene.— 1988.— 72, N 1—2.— P. 25—34.
35. Cole S. T., Honoré N. Transcription of the *sulA-ompA* region of *Escherichia coli* during the SOS response and the role of an antisense RNA molecule // Mol. Microbiol.— 1989.— 3, N 6.— P. 716—722.
36. Jaurin B. A promoter probe vector (*pJAC1*) that utilizes the *ampC* β -lactamase gene of *Escherichia coli* // Nucl. Acids Res.— 1987.— 15, N 20.— P. 8567.
37. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Особенности клонирования фрагментов *rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в плазмидах *pUC* // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 6.— С. 307—312.
38. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Ориентационные эффекты, вызываемые присутствием в плазмиде *pUC* фрагментов *rplJL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* // Там же.— 1988.— 4, № 3.— С. 163—167.
39. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Возможность клонирования гена регуляторного белка *rplJL*-оперона *Escherichia coli* в высококопийной плазмиде *pUC* обеспечивается конвергентной транскрипцией, инициируемой промотором *P_{lac}* вектора // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1989.— № 3.— С. 39—43.
40. Вудмаска М. И., Патон Е. Б. Клонирование участка *rplJL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в плазмидах *pBR322* и *pHSG415* // Докл. АН УССР.— 1987.— № 9.— С. 58—60.
41. Specific-purpose plasmid cloning vectors. 1. Low copy number temperature-sensitive, mobilization defective *pSC101*-derived containment vectors / T. Haschimoto-Gotoh, F. C. Franklin, A. Nordheim, K. N. Timmis // Gene.— 1981.— 16, N 3.— P. 227—235.
42. Гены, кодирующие β -субъединицу РНК-полимеразы бактерий. I. Первичная структура *EcoRI*-С-фрагмента гена *rpoB* *Salmonella typhimurium* / Е. Д. Свердлов, П. А. Лисицин, С. О. Гурьев и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 5.— С. 699—707.
43. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду *pUC19* // Биополимеры и клетка.— 1986.— 2, № 4.— С. 217—219.
44. Messing J. New *M13* vectors for cloning // Meth. Enzymol.— 1983.— 101.— P. 20—38.
45. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *rpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13mp8* и *M13mWB2348* // Биоорг. химия.— 1984.— 10, № 11.— С. 1544—1547.
46. Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Высокая стабильность рекомбинантного нитевидного фага *M13* со встроенным участком *rpoBC*-оперона *E. coli* // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 4.— С. 226—227.
47. Вудмаска М. И., Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Повышение стабильности рекомбинантного фага *M13*, содержащего гены *rplJL-rpoBC* *E. coli*, путем снижения экспрессии встроенных генов // Генетика.— 1990.— 26, № 3.— С. 557—559.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 10.05.90

УДК 579.25

© М. Ф. Алексеев, Н. А. Козыровская, 1990

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *

Обзор посвящен молекулярной генетике цианобактерий. Суммированы данные о системах генетического обмена эндогенных плазмидах, мобильных генетических элементах, специфических эндонуклеазах, перестройках генома, клонирующих векторах и клонировании генов.

Цианобактерии, или сине-зеленые водоросли,— единственные прокариоты, способные к кислородному фотосинтезу по типу высших растений.

* Представлена членом редколлегии В. А. Кордюмом.