Краткие сообщения

УДК 577.21

А. Н. Живолуп, Е. Б. Патон

ВОЗМОЖНОСТЬ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОПЕРОНА *rplJL* KLEBSIELLA PNEUMONIAE БЕЛКОМ L10 ESCHERICHIA COLI

Показана возможность достижения высокой эффективности трансформации K. pneumoniae методом электропорации. Выявлена регуляторная способность белков L10 E. coli с нативной и измененной первичной структурой в отношении генов оперона rplJL K. pneumoniae.

Продолжая наши исследования по изучению возможности регуляции экспрессии генов *rplJL* оперона энтеробактерий гетерологичными белками *L10* [1, 2], мы провели анализ влияния суперпродукции белков *L10 E. coli* (нативного и с измененной первичной структурой) на клетки *K. pneumoniae*. В качестве реципиента использовали штам *K. pneumoniae* NCTC 5054 (National collection of type culture, Central Public Health laboratory, Лондон). Плазмидную ДНК в клетки-реципиенты вводили методом электропорации, аналогичным описанному нами ранее для *Salmonella typhimurium* [2]. Следует особо отметить, что нас интересовал выбор оптимального способа введения чужеродной ДНК для ряда энтеробактерий. До настоящего времени мы сравнили эффективность введения плазмидной ДНК в *E. coli*, *S. typhimurium* и *K. pneumoniae* посредством трансформации клеток, обработанных $CaCl_2$ по стандартной методике [3], ее модификации [4] и электропорацией [2, 5]. Эксперименты показали, что введение интересовавших нас плазмид в клетки *E. coli* наиболее эффективно трансформацией $CaCl_2$-клеток по стандартной методике и ее модификациям [3]. Для *S. typhimurium* и *K. pneumoniae*, напротив, наибольшей эффективности можно добиться электропорацией. Оказалось, что клетки *E. coli* гораздо более чувствительны к концентрации соли в растворе ДНК, используемом для электропорации, и повышению температуры в процессе воздействия на клетки электрическим импульсом. В предварительных опытах была обнаружена прямая зависимость эффективности электропорации клеток *K. pneumoniae* от емкости конденсаторной батареи (времени импульса) и напряженности электрического поля вплоть до величин 14,5 мкФ и 27 кВ/см соответственно. Эффективность трансформации при этом составляла примерно 10^7 колоний на 1 мкг плазмиды *19XmaCAT* (Cm^r-производной *pUC19*). Эти же условия были использованы и в дальнейшем для введения плазмид, обеспечивающих экспрессию белков *L10*. Нас интересовал эффект повышенного синтеза в клетках *K. pneumoniae* нативного белка *L10 E. coli*, который в случае сохранения регуляторной способности в гетерологичном хозяине приводил бы к характерному эффекту — негативному влиянию повышенной продукции L10 на жизнеспособность клеток-хозяев. Этот негативный эффект обнаруживается по замедлению скорости роста клеток и снижению копийности плазмид, кодирующих регуляторноспособные белки [2].

© А. Н. ЖИВОЛУП, Е. Б. ПАТОН, 1992

В данной работе проведено сравнение влияния высоких уровней продукции в *K. pneumoniae* белков *L10* с разной первичной структурой: нативного белка *L10 E. coli*, продуцируемого с *pEP20* и *pE20-1* [2], *L10* с делецией 22 С-концевых аминокислот (*pEP14*) и мутацией Lys143, Glu144→Gln (*pEP22*) [6]. В качестве контроля использовали *pEP12-1*, с которой продуцировался *L10* с делецией 45 С-концевых аминокислот, приводящей к потере регуляторной способности этого белка [6].

На рисунке представлены результаты электрофореза ДНК перечисленных выше плазмид, выделенной щелочным методом [3] из трансформированных клеток *K. pneumoniae*. Как видно, копийность плазмид

Картина электрофоретического разделения ДНК плазмид, выделенных из аликвот жидкой культуры *K. pneumoniae*: *1—4, 6* — плазмиды *pEP20, pEP20-1, pEP12-1, pEP14* и *pEP22*, выделенные из клеток с *Lac*$^+$-фенотипом; *5, 7* — плазмиды *pEP14* и *pEP22* из клеток с *Lac*$^-$-фенотипом.

pEP20 и *pEP20-1* значительно ниже, чем у *pEP12-1*. Таким образом, белок *L10 E. coli* способен регулировать экспрессию генов *rplJL K. pneumoniae* (подавлять синтез белка *L12*, кодируемого геном *rplL* хромосомы).

Очень интересен тот факт, что белки с измененной первичной структурой (делецией 22 С-концевых аминокислотных остатков и мутацией Lys143, Glu144→Gln), не обладающие регуляторной способностью в клетках *E. coli* [1] и *S. typhimurium* [2], оказывали негативное действие на клетки *K. pneumoniae* (копийность плазмид *pEP14* и *pEP22* в этих клетках заметно снижалась по сравнению с контрольной плазмидой *pEP12-1*). Это наблюдение коррелирует с отмеченным Сором и Номурой [7] различием в регуляторной способности белка *L1 E. coli* по отношению к собственной и гетерологичным (*Serratia marcescens* и *Proteus vulgaris*) мишеням на мРНК.

Еще один из отмеченных нами феноменов — зависимость степени негативного эффекта регуляторноспособных белков *L10* от *Lac*-фенотипа клеток-хозяев *K. pneumoniae*. Как можно заметить (см. рисунок), в *Lac*$^+$-клетках *K. pneumoniae* (исходный штамм) копийность плазмид *pEP14* и *pEP22* была значительно ниже, чем в клетках с *Lac*$^-$-фенотипом (спонтанная мутация). *Lac*$^+$-фенотип усугубил негативное влияние присутствия в клетках *K. pneumoniae* плазмид *pEP20* и *pEP20-1*. Причина этого явления пока неясна. Экспериментально показана токсичность для клеток *E. coli* суперпродукции β-галактозидазы [8]. Поэтому на данном этапе исследований можно предположить, что продукция β-галактозидазы усугубляет негативный эффект повышенного синтеза регуляторноспособных белков *L10* в клетках *K. pneumoniae*.

Summary. High efficiency transformation of *K. pneumoniae* cells by high voltage electroporation was achieved. The *E. coli L10* protein with native and altered primary structures were found regulatory capable for genes of the *K. pneumoniae rplJL* operon.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. *Живолуп А. Н., Кириченко И. В., Патон Е. Б.* Рибосомный белок *L10 Escherichia coli* способен регулировать экспрессию генов *rplJL Salmonella typhimurium* // Биополимеры и клетка.— 1982.— 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., Живолуп 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 клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины, Киев

Получено 04.11.91.

УДК 577.217.5;577.18.02

Н. И. Шульга, А. П. Потапов

ВЛИЯНИЕ НЕОМИЦИНА НА ТРАНСЛЯЦИЮ ПОЛИ (U) И ПОЛИ (dT) В БЕСКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ ИЗ SACCHAROMYCES CEREVISIAE И NEUROSPORA CRASSA

Исследовано влияние различных концентраций ионов магния и аминогликозидного антибиотика неомицина на трансляцию поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из S. cerevisiae и N. crassa. Показано, что трансляция поли(U) и поли(dT) осуществляется цитоплазматическими рибосомами. Повышенные концентрации ионов магния стимулируют трансляцию поли (dT), неомицин в отличие от прокариотических систем оказывает угнетающее действие на трансляцию обеих матриц. Высказано предположение об эволюции структуры декодирующего центра рибосомы в направлении возрастания избирательности по отношению к структуре сахаро-фосфатного остова матрицы.

Введение. Гипотеза стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов была предложена для объяснения селекции аминоацил-тРНК на рибосоме [1, 2]. Она постулирует прямое взаимодействие декодирующего центра рибосомы с сахаро-фосфатным остовом кодон-антикодоновых комплексов, благодаря чему рибосома «оценивает» стерические параметры последних. Предполагается, что изменение стереохимических параметров кодон-антикодоновых дуплексов или декодирующего центра способно оказывать существенное влияние на точность процесса трансляции.

Природным полимером с измененным сахаро-фосфатным остовом является ДНК. Параллельное исследование трансляции поли(U) и поли(dT) в бесклеточных системах из прокариот показало, что повышенные концентрации ионов Mg^{2+} и антибиотик неомицин ингибиру-

© Н. И. ШУЛЬГА, А. П. ПОТАПОВ, 1992