

Summary. After introduction of ribosomal protein *L10* encoding plasmids into *S. typhimurium* cells by refined electroporation technique developed both of host cells growth rate and the plasmid copying decreasing effects were observed similar to those of *E. coli* cells found in, indicating a possibility of regulation *rplJL* *S. typhimurium* genes by *E. coli* *L10* proteins.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Nucleotide sequence of the *rplJL* operon and the deduced primary structure of the encoded *L10* and *L7/L12* proteins of *Salmonella typhimurium* compared to that of *Escherichia coli* / A. N. Zhyvoloup, M. I. Woodmaska, I. V. Kroupskaya, E. B. Paton // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 15.—P. 4620.
3. 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 Lett.—1990.—265, N 2.—P. 129—132.
4. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Определение минимального сегмента белка *L10* *E. coli*, сохраняющего регуляторную функцию // Докл. АН СССР.—1989.—309, № 2.—С. 493—496.
5. 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.
6. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—545 p.
7. Pfau J., Youderian P. Transferring plasmid DNA between different bacterial species with electroporation // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 20.—P. 6165.
8. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // Ibid.—1988.—16, N 13.—P. 6127—6145.
9. Патон Е. Б. Особенности регуляции экспрессии генов кластера *rplKAIL* // Биополимеры и клетка.—1990.—8, № 5.—С. 5—23.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев  
Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины, Киев

Получено 28.08.91

УДК 577.21

А. Н. Живолуп, И. В. Крупская, М. И. Вудмаска, Е. Б. Патон

#### СРАВНЕНИЕ IN VIVO РЕГУЛЯТОРНОЙ СПОСОБНОСТИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ L 10 С РАЗЛИЧНОЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ

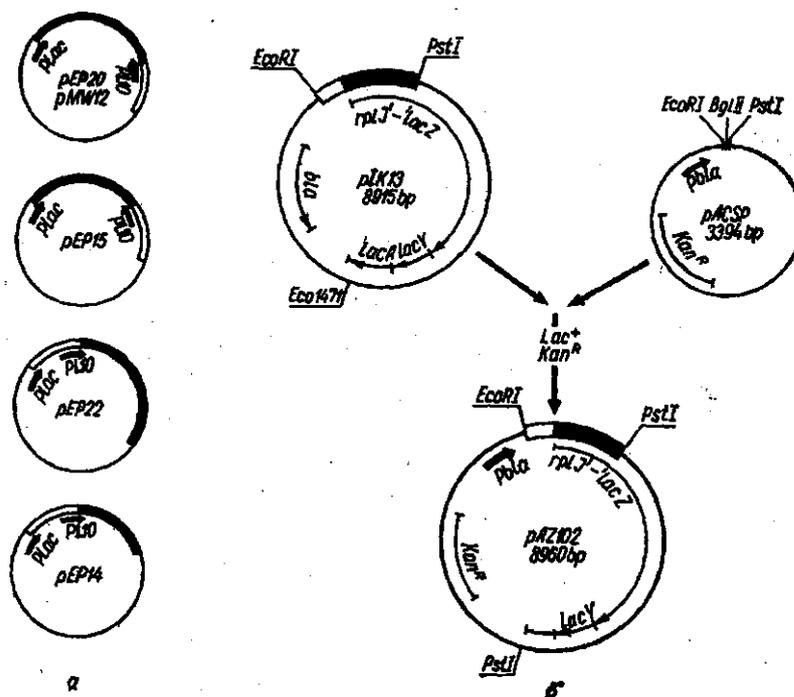
Разработана система оценки и проведено сравнение in vivo регуляторной способности рибосомных белков *L10*. Клетки *Escherichia coli* котрансформируются плазмидами — продуцентами *L10* и плазмидой с репортерным геном *rplJ'-lacZ*. Регуляторная способность оценивается по эффективности ингибирования белком *L10* экспрессии репортерного гена.

**Введение.** Экспрессия генов практически во всех оперонах рибосомных белков *Escherichia coli* регулируется на уровне трансляции ключевым регуляторным белком [1]. Рибосомный белок *L10* является таковым для оперона *rplJL* [1]. Суперэкспрессия с многокопийной плазмиды гена *rplJ*, кодирующего рибосомный белок *L10*, блокирует синтез белка *L7/L12*, кодируемого хромосомным *rplL*-геном. Это препятствует сборке рибосом [2] и является причиной летального или угнетающего рост нормальных клеток *E. coli* влияния таких плазмид. Негативный эффект суперпродукции белка *L10* можно преодолеть, используя мутантные клетки, например *JF3029* [3].

© А. Н. ЖИВОЛУП, И. В. КРУПСКАЯ, М. И. ВУДМАСКА, Е. Б. ПАТОН, 1992.

По данным Фризен и Эна [4], делеция 20 С-концевых аминокислотных остатков не нарушает регуляторной способности такого белка *L10*. Наши эксперименты по клонированию [5] показали, что хотя регуляторная способность «усеченного» *L10* и сохранялась, она была ниже по сравнению с нативным. Выявлено также, что благодаря высокой гомологии первичной структуры белков *L10 E. coli* и *Salmonella typhimurium* последний способен регулировать экспрессию генов *rplJL E. coli* [6]. Поддержание плазмиды *pMW12* с геном *rplJ S. typhimurium* было летальным для нормальных клеток-хозяев *E. coli* (*JM101*) и «безвредным» для мутантных клеток (*JF3029*).

Нас интересовала количественная оценка *in vivo* регуляторной способности белков *L10* с различными первичными структурами. В основе



Схематическое изображение плазмид, использованных для котрансформации (а), и конструирования плазмиды с репортерным геном *rplJ'-lacZ* (б)

такой оценки лежало введение в мутантные клетки *E. coli* пар плазмид, одна из которых являлась продуцентом *L10*, другая содержала репортерный ген *rplJ'-lacZ*, уровень экспрессии которого позволял судить о регуляторной эффективности изучаемого белка *L10*. Сайт взаимодействия с *L10* расположен в лидерной области мРНК *L10-L12* [3, 7], поэтому репортерный ген *rplJ'-lacZ* для тестирования регуляторной способности *L10*-белков был сконструирован с сохранением полной лидерной последовательности.

**Материалы и методы.** Конструирование, выделение и рестрикционный анализ рекомбинантных ДНК проводили, используя стандартные методы, описанные в [8]. Для совместного поддержания в клетках плазмид — продуцентов *L10* и плазмиды с репортерным геном следовало обеспечить им наличие различных селективных маркеров. Плазмиды — продуценты *L10*-белков были сконструированы на основе *pUC* и несли ген устойчивости к ампициллину. Плазмида с репортерным геном сконструирована на базе *pACSP* [9], обеспечивающей устойчивость к канамицину. ДНК плазмиды *pACSP* обрабатывали *BglII* (концы восполняли при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I) и *EcoRI* и лигировали с фрагментом *EcoRI-Eco1471* (5561 п. о.), полу-

ченным из *pIK13* [10]. Продукты лигирования были введены в клетки *JM101*. Рекомбинанты отбирали по *Lac*<sup>+</sup> *Кап*<sup>+</sup>-фенотипу. Конструирование *pAZ102* схематически показано на рисунке (б). Рестрикционным анализом по *PstI* подтверждено встраивание гена *rplJ'-lacZ*, который транскрибировался в *pAZ102* с *bla*-промотора *pACSP* [9].

Конструирование плазмид — продуцентов *L10*-белков детально описано в [5, 6]: *pEP20* кодировала синтез нативного *L10*-белка *E. coli*, *pEP15* — *L10 E. coli* с делецией 20 С-концевых аминокислотных остатков, *pEP14* — *L10 E. coli* с делецией 22 аминокислотных остатков в той же области, *pEP22* — *L10 E. coli* с мутацией *Lys*<sub>143</sub>*Glu*<sub>144</sub>→*Gln*, *pMW12* — нативный *L10 S. typhimurium*. Как показано ранее [5], *L10*-белки, кодируемые *pEP14* и *pEP22*, регуляторной способностью не обладают. В связи с этим данные плазмиды использованы как контрольные. Все плазмиды, использованные для котрансформации с *pAZ102*, схематически изображены на рисунке (а). Селекцию котрансформантов проводили на среде, содержащей по 50 мкг/мл ампициллина и канамицина, а также 200 мкг/мл X-gal [8]. Выделение и рестриктивный анализ ДНК из *Amp*<sup>r</sup>*Кап*<sup>r</sup>*Lac*<sup>+</sup>-клонов подтвердили наличие в них искомым пар плазмид.

Влияние различных *L10*-белков на экспрессию репортерного гена оценивали по активности кодируемой им β-галактозидазы, измеряемой по методу Миллера [11]. Оценку уровня экспрессии репортерного гена *rplJ'-lacZ* проводили на основании анализа пяти независимо отобранных клонов.

Во избежание спонтанной транскрипции с *lac*-промотора, находящегося в антисмысловой ориентации к *rplJ* в *pEP20*, *pEP15* и *pMW12*, клетки, используемые для измерения β-галактозидазной активности, растили в минимальной среде M9 [8]. Параллельно с измерением β-галактозидазной активности контролировали стабильность поддержания плазмид каждой пары.

Плазмида *pACSP* и мутантные клетки *E. coli JE3029* были любезно предоставлены проф. Дрейпером (США) и Фризенем (Канада).

**Результаты и обсуждение.** Полученные данные о влиянии исследуемых *L10*-белков на экспрессию репортерного гена *rplJ'-lacZ* приведены в таблице. Как показало сравнение, наибольшим ингибирующим эффектом обладает нативный *L10 E. coli*, кодируемый *pEP20*. Ингибирующее влияние (регуляторная активность) белка *L10 E. coli* с делецией 20 С-концевых аминокислотных остатков была ниже, чем у нативного *L10 E. coli*, однако выше, чем у нативного *L10 S. typhimurium*. Как указано в разделе «Материалы и методы», в качестве контрольных использованы плазмиды *pEP14* и *pEP22*, поскольку белки *L10*, кодируемые этими плазмидами, регуляторной способностью не обладали. Очень интересным оказалось то обстоятельство, что присутствие *pEP22* повышало уровень экспрессии репортерного гена. Наиболее вероятным объяснением этого представляется интерференция мутантного *L10* с нативным *L10* клеточного пула. Логично считать, что нативный *L10*, кодируемый хромосомным геном клетки-хозяина, несколько подавляет экспрессию репортерного гена. Показано [12], что комплекс с *L7/L12* стабилизирует *L10*, увеличивая его регуляторную способность. Для комплексобразования с *L7/L12* необходим С-конец [13], который сохранен у белка, кодируемого *pEP22*, в отличие от *pEP14*. Синтезирующийся в большом количестве с *pEP22* мутантный белок *L10*, по-видимому, оттитровывает *L7/L12* из комплекса с нативным, чем снижает стабиль-

Сравнение экспрессии репортерного гена *rplJ'-lacZ* в присутствии плазмид с генами *rplJ*

Плазмиды	Относительная активность β-галактозидазы, %
<i>pAZ102</i>	100
<i>pAZ102+pEP20</i>	33,9
<i>pAZ102+pEP15</i>	37,9
<i>pAZ102+pMW12</i>	47,5
<i>pAZ102+pEP22</i>	111,9

Примечание. Среднее квадратичное отклонение не превышало 5 %.

ность последнего и его ингибирующее влияние на экспрессию репортерного гена.

Сравнение регуляторной способности белков *L10 E. coli* и *S. typhimurium* по их влиянию на экспрессию репортерного гена *rplJ'-lacZ* подтвердило возможность гетерологичной регуляции, обнаруженной нами ранее [5]. Количественная оценка показала меньшую эффективность *L10 S. typhimurium* по сравнению с его аналогом из *E. coli*. Возможно, что белок *L10 S. typhimurium* обладает меньшим сродством к гетерологичному сайту-мишени, имеющему отличия в первичной [14] и редуцированной вторичной структуре [10]. Сравнение эффективности *L10 S. typhimurium* и *E. coli* в аналогичной системе с репортерным геном на основе *rplJ S. typhimurium* позволит сделать более определенные выводы.

**Резюме.** Розроблено систему оцінки та порівняно *in vivo* регуляторну здатність рибосомних білків *L10*. Клітини *Escherichia coli* котрансформуються плазмідами — продуцентами *L10* та плазмідом з репортерним геном *rplJ'-lacZ*. Регуляторна здатність оцінюється по ефективності пригнічування білком *L10* експресії репортерного гену.

**Summary.** A system for estimation and comparison of the regulatory ability of *L10* ribosomal proteins was elaborated. *pAZ102* plasmid, carrying the reporter *rplJ'-lacZ* gene was cointrduced into *Escherichia coli* cells together with the *L10*-producing plasmids. The regulatory ability of the assayed *L10* proteins was estimated by their efficient inhibition of expression of the reporter gene.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindahl L., Zenget J. M. Ribosomal genes in *Escherichia coli* // Ann. Rev. Genet.— 1986.— 20.— P. 297—326.
2. Post-transcriptional regulatory mutants in ribosomal protein-RNA polymerase operon of *E. coli* / N. Fill, J. D. Friesen, W. L. Downing, P. P. Dennis // Cell.— 1980.— 19, N 3.— P. 837—844.
3. Friesen J. D., Tropak M., An. G. Mutations in the *rplJ* leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // Ibid.— 1983.— 32, N 2.— P. 361—369.
4. Friesen J. D., An. G. The lethal effect of a plasmid resulting from transcriptional readthrough of *rplJ* from the *rplKA* operon in *Escherichia coli* // Mol. and Gen. Genet.— 1983.— 189.— P. 275—281.
5. Патон Е. Б., Крупская Н. В., Живолуп А. Н. Определение минимального сегмента рибосомного белка *L10 E. coli*, сохраняющего регуляторную функцию // Докл. АН СССР.— 1989.— 309, № 2.— С. 493—496.
6. 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 Lett.— 1990.— 265.— P. 129—132.
7. 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.
8. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning — a laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.— 545 p.
9. Tang C. K., Draper D. E. Unusual mRNA pseudoknot structure is recognized by a protein translational repressor // Cell.— 1989.— 57.— P. 531—536.
10. Патон Е. Б. Особенности регуляции экспрессии генов кластера *rplKAJL* // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 5.— С. 5—23.
11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 395 с.
12. Petersen C. *Escherichia coli* ribosomal protein *L10* is rapidly degraded when synthesized in excess of ribosomal protein *L7/L12* // J. Bacteriol.— 1990.— 172, N 1.— P. 431—436.
13. Liljas A. Structural studies of ribosomes // Progr. Biophys. and Mol. Biol.— 1982.— 40.— P. 161—228.
14. Nucleotide sequence of the *rplJL* operon and the deduced primary structure of the encoded *L10* and *L7/L12* proteins of *Salmonella typhimurium* compared to that of *Escherichia coli* / A. N. Zhyvolup, M. I. Woodmaska, I. V. Kroupskaya, E. B. Paton // Nucl. Acids Res.— 1990.— 18, N 15.— P. 4620.

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

Получено 28.08.91