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 votage electroporation // Ibid.— 1988.— **16**, N 13.— P. 6127—6145.
9. *Патон Е. Б.* Особенности регуляции экспрессии генов кластера *rplKAJL* // Биополимеры и клетка.— 1990.— **6**, № 5.— С. 5—23.

Ін-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ
Ін-т клітин. біології і генет. інженерії АН України, Київ

Одержано 28.08.91

УДК 577.21

О. М. Живолуп, І. В. Крупська, М. І. Вудмаска, Є. Б. Патон

ПОРІВНЯННЯ IN VIVO РЕГУЛЯТОРНОЇ ЗДАТНОСТІ РИБОСОМНИХ БІЛКІВ L 10 З РІЗНОЮ ПЕРВИННОЮ СТРУКТУРОЮ

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

Вступ. Експресія генів практично в усіх оперонах рибосомних білків *Escherichia coli* регулюється на рівні трансляції ключовим регуляторним білком [1]. Рибосомний білок *L10* є саме таким для оперону *rplJL* [1]. Суперекспресія з багатокопійної плазміди гену *rplJ*, який кодує рибосомний білок *L10*, блокує синтез білка *L7/L12*, що кодується хромосомним *rplL*-геном. Це перешкоджає збиранню рибосом [2] і є причиною летального або пригнічуючого ріст нормальних клітин *E. coli* впливу таких плазмід. Негативний ефект суперпродукції білка *L10* можна подолати, використовуючи мутантні клітини, наприклад *JF3029* [3].

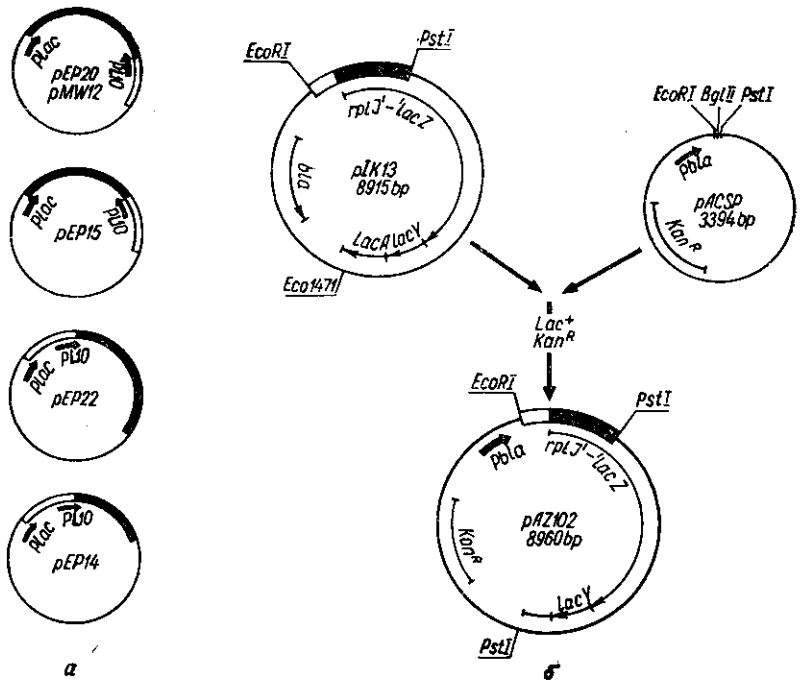
За даними Фрізена та Ена [4], делеція 20 С-кінцевих амінокислотних залишків не порушує регуляторної здатності такого білка *L10*. Наші експерименти з клонування [5] показали, що, не дивлячись на збереження регуляторної здатності «відсіченого» *L10*, вона була нижчою порівняно з нативним. Виявлено також, що завдяки високій гомології первинної структури білків *L10 E. coli* і *Salmonella typhimurium* останній здатний регулювати експресію генів *rplJL E. coli* [6]. Підтримування плазміди *pMW12* з геном *rplJL S. typhymurium* було летальним для нормальних клітин-хазяїв *E. coli (JM101)* і «нешкідливим» для мутантних клітин (*JF3029*).

Нас цікавила кількісна оцінка *in vivo* регуляторної здатності білків *L10* з різними первинними структурами. Засадою такої оцінки було введення до мутантних клітин *E. coli* пар плазмід, одна з яких була продуцентом *L10*, друга містила репортерний ген *rplJ'-lacZ*, рівень експресії котрого дозволяв робити висновки про регуляторну ефектив-

© О. М. ЖИВОЛУП, І. В. КРУПСЬКА, М. І. ВУДМАСКА, Є. Б. ПАТОН, 1992

ність білка *L10,* що вивчався. Сайт взаємодії з *L10* розташований у лідерній області мРНК *L10-L12* [3, 7], тому репортерний ген *rplJ'-lacZ* для тестування регуляторної здатності *L10*-білків було зконструйовано із збереженням повної лідерної послідовності.

Матеріали і методи. Конструювання, виділення та рестрикційний аналіз рекомбінантних ДНК провадили, використовуючи стандартні методи, наведені у [8]. Для спільного підтримування у клітинах плазмід — продуцентів *L10* та плазміди з репортерним геном слід було забезпечити їм наявність різних селективних маркерів. Плазміди — продуценти *L10*-білків були зконструйовані на основі *pUC* і несли ген



Схематичне зображення плазмід, використаних для котрансформації (*а*), та конструювання плазміди з репортерним геном *rplJ'-lacZ* (*б*)

стійкості до ампіциліну. Плазміда з репортерним геном зконструйована на базі *pACSP* [9], яка забезпечує стійкість до канаміцину. ДНК плазміди *pACSP* обробляли *BglII* (кінці доповнювали за допомогою фрагменту Кленова ДНК-полімерази I) і *EcoRI* та лігували з фрагментом *EcoRI-Eco1471* (5561 п. о.), який було отримано з *pIK13* [10]. Продукти лігування було введено до клітин *JM101.* Рекомбінанти відбирали за *Lac*$^+$-*Kan*^{r}-фенотипом. Конструювання *pAZ102* схематично наведено на малюнку (*б*). Рестрикційним аналізом за *PstI* підтверджено вбудовування гену *rplJ'-lacZ,* який транскрибувався у *pAZ102* з *bla*-промотору *pACSP* [9].

Конструювання плазмід — продуцентів *L10*-білків детально надано у [5, 6]. *pEP20* кодувала синтез нативного *L10*-білка *E. coli, pEP15—L10 E. coli* з делецією 20 С-кінцевих амінокислотних залишків, *pEP14—L10 E. coli* з делецією 22 амінокислотних залишків у тій самій області, *pEP22—L10 E. coli* з мутацією $Lys_{143}Glu_{144}$→Gln, *pMW12*— нативний *L10 S. typhimurium.* Як показано раніше [5], *L10*-білки, що кодуються *pEP14* і *pEP22,* регуляторної здібності не мають. У зв'язку з цим дані плазміди використовували як контрольні. Усі плазміди, використані для котрансформації з *pAZ102,* схематично зображені на малюнку (а). Селекцію котрансформантів провадили на середовищі, що містить по 50 мкг/мл ампіциліну і канаміцину, а також 200 мкг/мл X-gal [8]. Виділення та рестрикційний аналіз ДНК з Amp^{r}Kan^r*Lac*$^+$-клонів підтвердили наявність в них шуканих пар плазмід.

Вплив різних *L10*-білків на експресію репортерного гену оцінювали за активністю кодованої їм β-галактозидази, яку вимірювали за методом Міллера [11]. Оцінку рівня експресії репортерного гену *rplJ'-lacZ* провадили, грунтуючись на аналізі п'яти незалежно відібраних клонів.

Уникаючи спонтанної транскрипції з *lac*-промотору, що знаходиться у антисмисловій орієнтації до *rplJ* у *pEP20, pEP15* та *pMW12*, клітини, які використовуються для вимірювання β-галактозидазної активності, вирощували у мінімальному середовищі М9 [8]. Паралельно з вимірюванням β-галактозидазної активності контролювали стабільність підтримування плазмід кожної пари.

Плазміда *pACSP* та мутантні клітини *E. coli JF3029* були люб'язно надані проф. Дрейпером (США) і Фрізеном (Канада).

Порівняння експресії репортерного гену rplJ'-lacZ у присутності плазмід з генами rplJ

Плазміди	Відносна активність β-галактозидази, %
pAZ102	100
pAZ102+pEP20	33,9
pAZ102+pEP15	37,9
pAZ102+pMW12	47,5
pAZ102+pEP22	111,9

Примітка. Середнє квадратичне відхилення не перевищувало 5 %.

Результати і обговорення. Отримані дані про вплив *L10*-білків, що досліджувалися, на експресію репортерного гену *rplJ'-lacZ* наведено у таблиці. Як показало порівняння, найбільший пригнічуючий ефект має нативний *L10 E. coli,* що кодується *pEP20.* Пригнічуючий вплив (регуляторна активність) білка *L10 E. coli* з делецією 20 С-кінцевих амінокислотних залишків був нижчим, ніж у нативного *L10 E. coli,* проте вищим, ніж у нативного *L10 S. typhimurium.* Як зазначено у розділі «Матеріали і методи», як контрольні використовувалися плазміди *pEP14* і *pEP22*, оскільки білки *L10*, що кодуються цими плазмідами, регуляторної здатності не мали. Дуже цікавою виявилася та обставина, що присутність *pEP22* підвищувала рівень експресії репортерного гену. Найбільш вірогідним поясненням цього видається інтерференція мутантного *L10* з нативним *L10* клітинного пула. Логічно вважати, що нативний *L10,* який кодується хромосомним геном клітини-хазяїна, дещо пригнічує експресію репортерного гену. Показано [12], що комплекс з *L7/L12* стабілізує *L10*, збільшуючи його регуляторну здатність. Для комплексоутворення з *L7/L12* є небхідним С-кінець [13], збережений у білка, якій кодується *pEP22*, на відміну від *pEP14.* Мутантний білок *L10*, що синтезується у великій кількості з *pEP22*, мабуть, відтитровує *L7/L12* із комплексу з нативним, чим знижує стабільність останнього та його пригнічуючий вплив на експресію репортерного гену.

Порівняння регуляторної здатності білків *L10 E. coli* та *S. typhimurium* за їх впливом на експресію репортерного гену *rplJ'-lacZ* підтвердило можливість гетерологічної регуляції, яка була виявлена нами раніше [5]. Кількісна оцінка виявила меншу ефективність *L10 S. typhimurium* порівняно з його аналогом з *E. coli.* Можливо, що білок *L10 S. syphimurium* має меншу спорідненість із гетерологічним сайтом-мішенню, який має відміни у первинній [14] та редукованій вторинній структурі [10]. Порівняння ефективності *L10 S. typhimurium* і *E. coli* в аналогічній системі з репортерним геном на основі *rplJ S. typhimurium* дозволить зробити більш певні висновки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Lindahl L., Zengel 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.* Mutation in the *rplJ* leader of *Escherichia coli* that abolisch feedback regulation // Ibid.— 1983.— **32**, N 2.— P. 361—369.

4. *Friesen J. D., Aa G.* The lethal effect of a plasmid resulting from transcriptional read-through of *rplJ* from the *rplKA* operon in *Escherichia coli* // Mol. and. Gen. Genet.— 1983.— **189**.— P. 275—281.
5. *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.
6. *Evidence* for the ability of *L10* ribosomal protein 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 DNA 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 *rplKJL* // 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. Zhyvoloup, M. I. Woodmaska, I. V. Kroupskaya, E. B. Paton // Nucl. Acids Res.— 1990.— **18**, N 15.— P. 4620.

Ін-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ Одержано 28.08.91