

Замена *groEL* гена *Escherichia coli* его ГОМОЛОГОМ из *Sinorhizobium meliloti*

В. Н. Ерко, П. А. Ланд¹

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

¹Школа биологических наук, Бирмингемский университет
Бирмингем, B15 2TT, Англия

В работе показано, что ген groEL S. meliloti, кодирующий субъединицы шаперонина с молекулярной массой 60 кДа, комплементирует делецию гена groEL E. coli, осуществленную путем замены groEL на prtII ген с помощью трансдукции фагом P1. При этом для экспрессии гена groEL из S. meliloti в клетках E. coli использована плазмида с промотором арабинозного оперона E. coli, что позволило тонко регулировать синтез шаперонинов содержанием арабинозы и глюкозы в среде выращивания. Метод замены хромосомного гена groEL на гетерологичный groEL, примененный в данной работе, позволяет изучать свойства гомологичных шаперонинов в клетке, не несущей дополнительно температурочувствительных шаперонинов и, таким образом, избежать нежелательного взаимодействия шаперонинов различного происхождения и включения в один шаперонин гетерологичных субъединиц.

Введение. Известно, что шаперонины бактерий отвечают за посттрансляционную сборку многих белков бактериальной клетки, давая им возможность правильно собираться до индивидуальной для каждого белка функционально активной структуры. Шаперонин GroEL *E. coli*, являющийся одним из наиболее хорошо изученных, представляет собой полый цилиндр, состоящий из двух тороидов, каждый из которых объединяет в себе семь субъединиц с молекулярной массой около 60 кДа [1]. Субъединицы шаперонинов у микроорганизмов кодируются геном *groEL*, организованным в один оперон с геном *groES*, который кодирует ко-шаперонин GroES [2]. К настоящему времени клонировано большое количество генов, кодирующих шаперонины у различных микроорганизмов [3, 4]. Все эти гены обладают высоким уровнем гомологии, что свидетельствует о крайней консервативности функций, выполняемых шаперонинами в клетке.

Большинство организмов несет только одну копию генов для синтеза шаперонинов. В отличие от них клубеньковые бактерии содержат от трех до

шести таких копий, экспрессирующихся в зависимости от изменения условий окружающей их среды [4, 6, 7].

Известно, что мутанты клубеньковых бактерий люцерны *S. meliloti*, у которых один из генов *groEL* инактивирован инсерцией транспозона Tn5, проявляют в симбиозе с растениями задержку клубенькообразования и Fix⁻-фенотип. Введение оперона *groESL E. coli* в такие мутанты не приводит к восстановлению азотфиксации в симбиозе с люцерной [5]. Обратное введение гена *groEL S. meliloti* в температурочувствительный штамм *E. coli* приводит к неполной комплементации температурочувствительности этого штамма кишечной палочки, вызванной мутацией в гене *groEL*, ограничивающей рост при 37 °C [5]. Однако результаты такого эксперимента не являются однозначными, так как в случае экспрессии в *E. coli* гена *groEL* из *S. meliloti* в клетке кишечной палочки изначально присутствует температурочувствительный шаперонин. Экспрессия двух шаперонинов различного происхождения в одной клетке может приводить к взаимодействию их субъединиц и нечеткости фенотипического проявления нововведенного шаперонина.

В данной работе проведено изучение свойств одного из пяти шаперонинов из *S. meliloti* в клетках *E. coli*. При этом ген *groEL* кишечной палочки был заменен на ген устойчивости к канамицину методом трансдукции фагом P1. Такой подход значительно облегчает анализ мутаций в генах синтеза шаперонинов, которые вводят в *E. coli*, поскольку в этом случае в клетке отсутствует температурочувствительный гомолог шаперонина.

Материалы и методы. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, приведены в таблице.

Штаммы *E. coli* выращивали на твердой или жидкой среде LB [11] при температуре 37 °С.

Трансдукцию с помощью фага P1 осуществляли, как описано в [11]. Фаг размножали лизисом штамма *E. coli* TG1 Δ*groEL* на чашках с LB.

Ферменты для работы с ДНК приобретены у «BRL», «Promega» (США) и «New England Biolabs» (Англия) и использованы в соответствии с [12].

Препарат плазмидной ДНК готовили по методу Бирнбойма и Доли [13].

Реакции амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) Таq-полимеразы проводили в термоциклере Techne DB3. Амплификацию фрагмента ДНК с частью *groES* и *nptII*

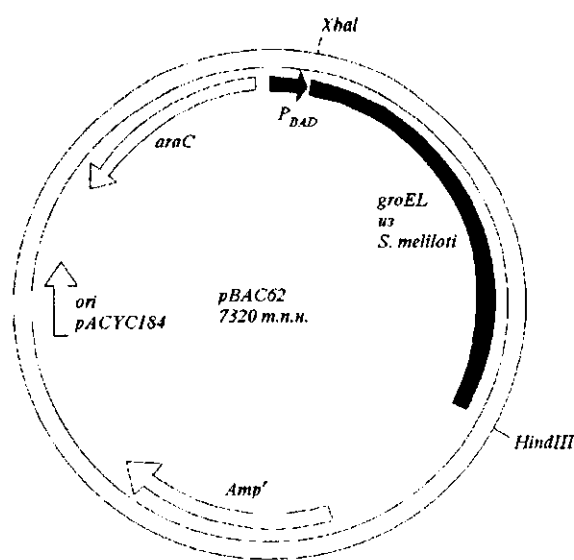


Рис. 1. Карта плазмиды pBAC62

генов осуществляли с помощью праймеров D5900 и D2356 (Alta Bioscience, University of Birmingham) при следующих условиях: денатурация — 93 °С, 1 мин 45 с; отжиг — 60 °С, 1 мин 45 с; синтез — 72 °С, 2 мин, 30 циклов. Для амплификации использовали ночную культуру *E. coli*.

Результаты. Для замены гена *groEL* штамма *E. coli* TG1 на ген *nptII*, кодирующий неомицинфототрансферазу, определяющую устойчивость бактерий к антибиотику канамицину, мы, прежде всего, сконструировали вектор экспрессии pBAC62. При этом ген *groEL* из *S. meliloti* был введен в плазмиду pBAD30 по XbaI- и HindIII-сайтам (рис. 1) под промотор арабинозного оперона *E. coli*.

Регуляция арабинозного промотора осуществляется белком araC, действующим либо как репрессор, либо как активатор транскрипции в зависимости от источника углерода, присутствующего в среде роста бактерии. Наличие арабинозы приводит к повышению экспрессии генов, находящихся под арабинозным промотором, в то время как глюкоза может полностью репрессировать синтез с арабинозного промотора. В результате изменения этих компонентов среды возможна тонкая регуляция экспрессии *groEL* гена в плазмиде pBAC62.

Мы ввели вектор для экспрессии pBAC62 в штамм *E. coli* TG1, который затем обработали

Бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы и плазмиды	Фенотип и генотип	Источник
Бактерии		
<i>E. coli</i> TG1	Δ(<i>lac-pro</i>) <i>hsdD5</i> ($r_k^- mk^-$) <i>thi</i> F' [<i>traD36 proAB lacIq lacZΔM15</i>]	[8]
<i>E. coli</i> TG1 Δ <i>groEL</i>	Дериват штамма <i>E. coli</i> TG1, несущий <i>nptII</i> ген вместо <i>groEL</i> и плазмиду pBAD-EL с геном <i>groEL</i> , находящимся под регуляцией промотора P _{BAD}	[9]
<i>E. coli</i> TG62	Дериват штамма <i>E. coli</i> TG1, несущий <i>nptII</i> ген вместо <i>groEL</i> и плазмиду pBAC62 с геном <i>groEL</i> из <i>S. meliloti</i> под промотором P _{BAD}	Данная работа
Плазмиды		
pBAD30	Ap ^R , araC P _{BAD}	[10]
pBAC62	Дериват плазмиды pBAD30, несущий ген <i>groEL</i> из <i>S. meliloti</i> под промотором P _{BAD}	Данная работа
pBAD-EL	Дериват pBAD30, несущий ген <i>groEL</i> из <i>E. coli</i> под промотором P _{BAD}	[9]

P1-фаголизатом штамма *E. coli* TG1 $\Delta groEL$ (рис. 2). Штамм *E. coli* TG1 $\Delta groEL$ несет плазмиду *pBAD-EL* с геном *groEL* под арабинозным промотором. Эта плазида комплементирует делецию хромосомного гена *groEL*, замененного на *nptII* ген [9].

После того как развитие фага в штамме *E. coli* TG1 (*pBAC62*) было остановлено, клетки высеяли на твердую среду LB с канамицином (10 мкг/мл), карбенициллином (200 мкг/мл) и арабинозой (0,2 %). Все 55 клонов, появившихся на следующий день на этой селективной среде, росли также на чашках LB, в которых концентрация канамицина была увеличена до 50 мкг/мл. Контрольный высев фаголизата не привел к появлению каких-либо клонов. Шесть клонов из 55, обозначенных *E. coli* TG62, были проверены на рост в жидких средах. Все они росли на жидкой среде LB с арабинозой (0,2 %), канамицином (50 мкг/мл) и карбенициллином (200 мкг/мл), но были неспособными к росту на аналогичной среде без арабинозы, т. е. при значительном уменьшении синтеза шаперонинов с гена *groEL* из *S. meliloti*, находящегося под арабинозным промотором в плазмиде *pBAC62*.

Получение мутантного штамма *E. coli* TG62 с делецией хромосомного *groEL* гена, комплементированной геном *groEL* из *S. meliloti* в составе плазмиды *pBAC62*, было подтверждено рестрикционным анализом плазмиды *pBAC62*, выделенной из штамма *E. coli* TG62, а также ПЦР жидкой культуры штамма *E. coli* TG62 с праймерами D5900 (Alta Bioscience; верхний праймер, кодирует участок *groES* гена, находящегося перед геном *groEL* в одном опероне с ним) и D2356 (Alta Bioscience; нижний праймер, кодирует участок *nptII* гена). Делеция *groEL* гена на хромосоме при его замене на ген *nptII* приводит к появлению фрагмента ДНК длиной 662 п. н. (рис. 3, а, дорожка 4, и рис. 3, б). ПЦР ДНК штамма *E. coli* TG1 $\Delta groEL$, построенного ранее [9] и несущего замену хромосомного *groEL* гена на ген *nptII* с комплементацией геном *groEL* из этого же штамма на плазмиде *pBAD-EL*, служит положительным контролем (рис. 3, а, дорожка 3). ПЦР штамма *E. coli* TG1 (*pBAC62*), исходного штамма для комплементации функции *groEL* гена геном *cpn60-2x* с помощью трансдукции, служит отрицательным контролем (рис. 3, а, дорожка 2). Появление дополнительного слабовыраженного фрагмента ДНК длиной около 400 п. н. в отрицательном контроле, по всей видимости, является результатом неспецифического связывания праймера D2356 в районе *groEL* гена, вызванного данными условиями амплификации.

Таким образом, штамм *E. coli* TG62 несет

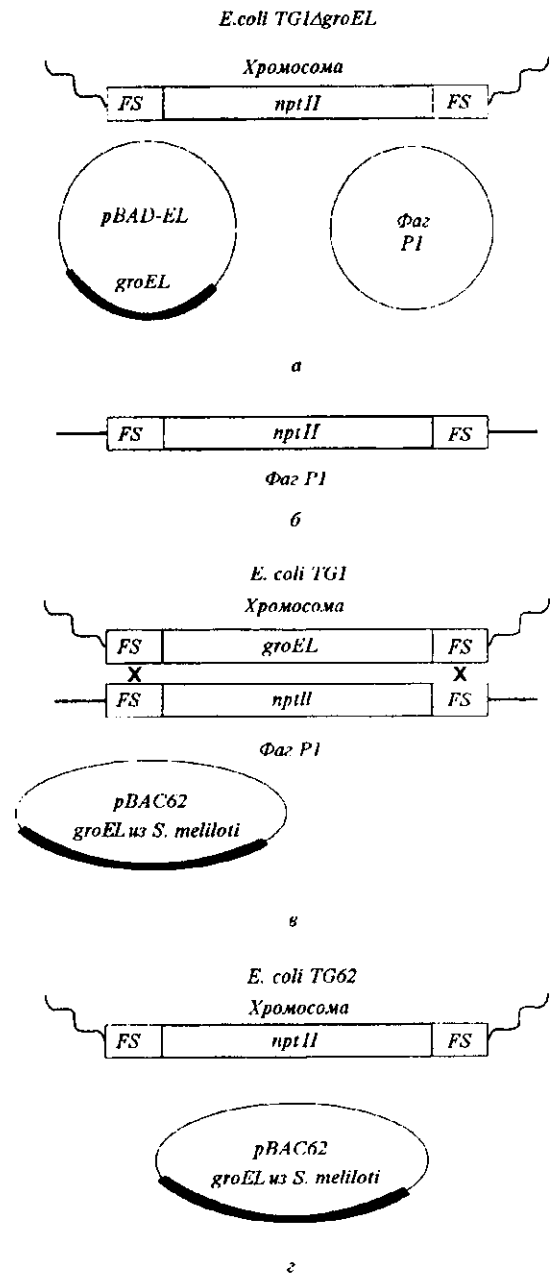


Рис. 2. Схема замены хромосомного гена *groEL* TG1 *E. coli* *nptII* (а); инфицирование *E. coli* TG1 $\Delta groEL$ (*pBAD-EL*) умеренным трансдуцирующим бактериофагом P1 (б); получение P1 фаголизата *E. coli* TG1 $\Delta groEL$ (*pBAD-EL*) с включением в фаги фрагментов хромосомы бактерии длиной до 20 тыс. п. н. (в); инфицирование *E. coli* TG1 (*pBAC62*) суспензией рекомбинантных бактериофагов P1 и двойная рекомбинация по гомологии между идентичными фланкирующими последовательностями (FS) генов *groEL* и *nptII* (г). Результирующий штамм *E. coli* TG62

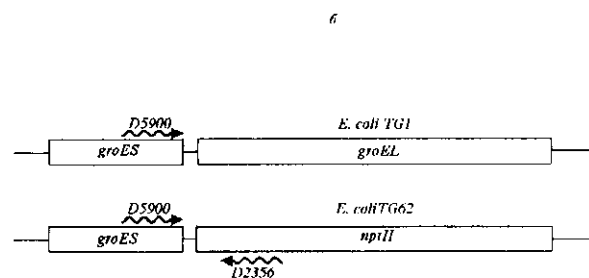
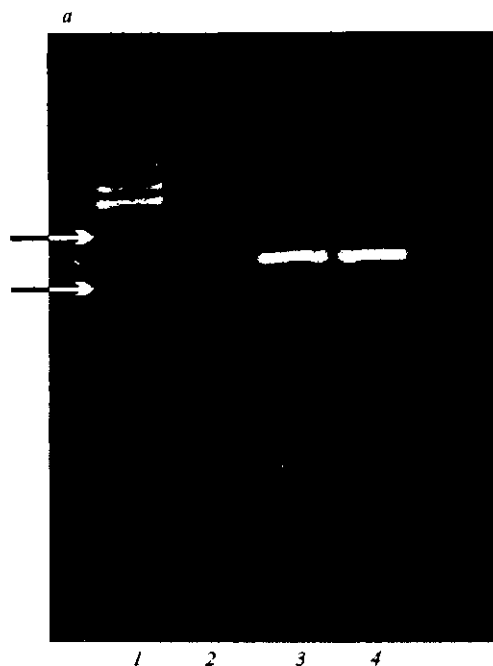


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами D5900 и D2356 как подтверждение замены хромосомного гена *groEL* на ген *nptII* в штамме *E. coli* TG62 (а: 1 — 1 тыс. п. н. ДНК Ladder («Gibco BRL»; стрелками указаны фрагменты ДНК длиной 517 и 1018 п. н.); 2 — *E. coli* TG1 (*pBAD62*); 3 — *E. coli* TG1 *groEL*; 4 — *E. coli* TG62; объяснения см. в тексте) и схема прикрепления праймеров для ПЦР к хромосомной ДНК контрольного штамма TG1 и штамма TG62 (б)

только один ген синтеза шаперонина из *S. meliloti*, находящийся на плазмиде *pBAD62*, и не содержит дополнительного температурочувствительного гена *groEL*, используемого для исследования физиологических свойств штаммов, экспрессирующих мутантные или гетерологичные GroEL белки.

Морфология колоний штамма *E. coli* TG62 не отличалась от таковой колоний штамма *E. coli* TG1 при росте на агаризованной среде LB при температуре 37 °С.

Для исследования физиологических изменений в клетке, вызванных заменой шаперонина *E. coli* на гетерологичный шаперонин из *S. meliloti*, штаммы кишечной палочки TG1 (*pBAD-EL*), TG1 (*pBAD62*), TG1 Δ *groEL* (*pBAD-EL*) и TG62 (*pBAD62*) были проверены на способность к росту в жидкой среде LB с арабинозой (0,2 %) и карбенициллином (200 мкг/мл) при температурах 37, 40 и 42 °С (рис. 4). Способность к росту проверяли высевом разведений на чашки LB с карбенициллином и арабинозой. Штаммы TG1 (*pBAD-EL*) и TG1 (*pBAD62*) использовали в качестве контроля эффекта, оказываемого плазмидами, производными от *pBAD30*. Кривые роста для штаммов TG1 (*pBAD-EL*), TG1 (*pBAD62*) и TG1 Δ *groEL* (*pBAD-EL*), т. е. для штаммов, в которых экспрессировался *groEL* ген *E. coli*, находящийся либо на плазмиде, либо на хромосоме, были фактически идентичными. Поэто-

му на рис. 4 все они обозначены, как кривые роста штамма TG1. Из графиков видно, что кривая роста штамма TG62 при температуре 37 °С похожа на кривую роста штамма TG1. Однако время удвоения клеток штамма TG62 значительно увеличено и составляет около 2—4 ч по сравнению с 1 ч, характерным для родительского штамма. При повышении температуры до 42 °С после очень незначительного повышения титра клеток *E. coli* TG62 в среде их количество последовательно уменьшалось.

Сложность строения шаперонинового комплекса предполагает двойственное объяснение отмеченного эффекта неспособности шаперонина из клубеньковых бактерий люцерны комплекментировать шаперонин из *E. coli* при повышении температуры. Отличия в аминокислотных последовательностях между GroEL субъединицами *E. coli* и *S. meliloti* могут сказываться на стабильности шаперонинового комплекса при повышенной температуре, например, могут возникать изменения структуры пространства Анфинсена шаперонина или изменения, приводящие к его неспособности связывать АТФ. В то же время наличие у ризобий нескольких функционально активных гомологичных шаперонинов предполагает различие субстратов, которые шаперонины собирают в зависимости от изменения условий окружающей среды (в частности, при симбиозе) либо различия в эффективности сборки этих

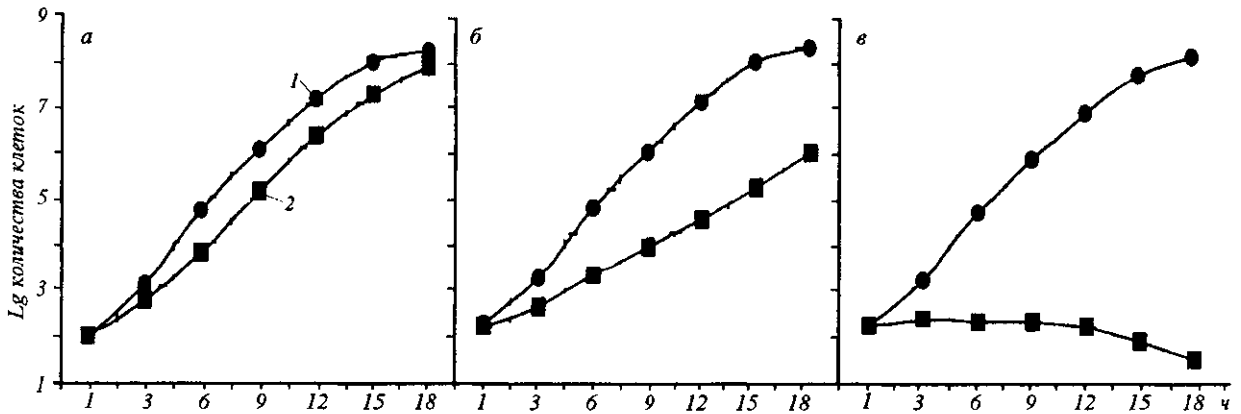


Рис. 4. Кривые роста жидких культур штаммов TG1 (1) и TG62 (2) *E. coli* при температурах 37 (а), 40 (б) и 42 (в) °С. Представленные данные являются средними трех независимых измерений в четырех повторностях

субстратов. Повышение температуры и, как следствие, конформационные изменения шаперонина могут приводить к изменению круга белков, собираемых шаперонином. В этот круг белков могут не входить некоторые жизненно важные белки *E. coli*, что и приводит к гибели клетки. Такое объяснение кажется вполне вероятным исходя из того факта, что клубеньковые бактерии способны к росту при температурах до 50 °С. Изменения в круге белков, собираемых данным шаперонином, могут компенсироваться другими гомологичными шаперонинами, находящимися в клетке клубеньковой бактерии. Таким образом, круг белков, собираемых гомологичными шаперонинами, может не совсем совпадать. Но за счет сужения этого круга шаперонины могут более эффективно работать в зависимости от изменения условий окружающей среды, что может быть особенно важно для клубеньковой бактерии как организма, синтезирующего огромный пул новых белков при вступлении в симбиоз и азотфиксации. Такое объяснение, однако, требует дополнительных исследований, направленных на изучение специфичности гомологичных шаперонинов к белкам клетки или проверки всех шаперонинов *S. meliloti* на температурочувствительность в клетке *E. coli*.

Работа выполнена по гранту от The Royal Society. Авторы признательны А. Л. Здоровенко за помощь в оформлении статьи.

В. М. Єрко, П. А. Ланд

Заміна *groEL* гена *Escherichia coli* його гомологом із *Sinorhizobium meliloti*

Резюме

У роботі показано, що ген *groEL* *S. meliloti*, який кодує субодиниці шапероніна з молекулярною масою 60 кДа, компенсує делецію гена *groEL* *E. coli*, здійснену шляхом заміни *groEL* на *nptII* ген за допомогою трансдукції фагом P1. При цьому для експресії гена *groEL* з *S. meliloti* в клітинах *E. coli* використано плазмиду з промотором арабінозного оперону *E. coli*, що дозволило тонко регулювати синтез шаперонінів кількістю арабінози і глюкози в середовищі вирощування. Метод заміни хромосомного гена *groEL* на гетерологічний *groEL* дозволяє вивчати властивості гомологічних шаперонінів у клітині, яка не несе додатково температурочувливих шаперонінів і, таким чином, уникнути небажаної взаємодії шаперонінів різного походження і включення в один шаперонін гетерологічних субодиниць.

V. N. Yerko, P. A. Lund

Replacement of *groEL* gene of *Escherichia coli* by its homologue from *Sinorhizobium meliloti*

Summary

We show that *groEL* gene from *S. meliloti* coding for chaperonin's subunits with molecular weight 60 kDa complements deletion of *groEL* gene of *E. coli* accomplished by replacement of *groEL* by *nptII* gene using P1 phage transduction. For expression of *groEL* gene from *S. meliloti* in *E. coli* cells we used plasmid with *E. coli* arabinose promoter allowing tight regulation of chaperonin biosynthesis by varying concentration of arabinose and glucose in growth medium. The method of replacement of chromosomal *groEL*

gene by heterologous *groEL* allows investigation of chaperonin's behavior in a cell that does not carry additionally temperature sensitive chaperonins and thus allows to avoid undesirable interaction of chaperonins of different origin and inclusion of heterologous subunits into the same chaperonin.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hartl F. U., Martin J. Molecular chaperones in cellular protein folding // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1995.—5.—P. 92—102.
2. McLennan N. F., McAteer S., Masters M. The tail of a chaperonin the C-terminal region of *Escherichia coli* GroEL protein // *Mol. Microbiol.*—1994.—14, N 2.—P. 309—321.
3. Hubner P., Dame G., Sandmeier U., Vandekerckhove J., Beyer P., Tadros M. H. Molecular analysis of the *Rhodobacter capsulatus* chaperonin (*groESL*) operon-urification and characterization of *Cpn60* // *Arch. Microbiol.*—1996.—166, N 3.—P. 193—203.
4. Rusanganva E., Gupta R. S. Cloning and characterization of multiple *groEL* chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti* // *Gene*.—1993.—126.—P. 67—75.
5. Ogawa J., Long S. R. The *Rhizobium meliloti groELc* locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD // *Genes and Develop.*—1995.—9.—P. 714—729.
6. Wallington E. J., Lund P. A. *Rhizobium leguminosarum* contains multiple chaperonin (*cpn60*) genes // *Microbiology*.—1994.—140.—P. 113—122.
7. Ерко В. Н., Ланд П. А. Ген *cpn60-1*, кодирующий один из гомологичных шаперонинов у *Rhizobium leguminosarum*, является важным для жизнедеятельности клетки // *Биополимеры и клетка*.—1999.—15, № 6.—С. 516—521.
8. Gibson T. PhD thesis.—Cambridge: Univ. press, 1997.
9. Ivic A., Olden D., Wallington E. J., Lund P. A. Deletion of *Escherichia coli groEL* is complemented by a *Rhizobium leguminosarum groEL* homologue at 37 °C but not at 43 °C // *Gene*.—1997.—194.—P. 1—8.
10. Guzman L.-M., Belin D., Carson M. J., Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high level expression by vectors containing the *pBAD* promoter // *Bacteriology*.—1995.—177.—P. 4121—4130.
11. Miller J. H. Short course in bacterial genetics.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1992.
12. Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E. F. Molecular Cloning. A Laboratory Manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
13. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7.—P. 1513—1523.

УДК 576.851.48/155
Поступила в редакцию 14.06.99