



УДК 577.21

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

КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ *lacZ* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *rplJL*-ОПЕРОНА *ESCHERICHIA COLI*

С использованием в качестве векторной плазмиды *pNM481* было проведено слияние 5'-концевых фрагментов генов *rplJ* и *rplL* с геном *lacZ* и сравнение уровней активности β -галактозидазы, обеспечиваемых присутствием в клетках гибридных генов *rplJ'-lacZ* и *rplL'-lacZ*. Не обнаружено влияния промотора P_{L12} на эффективность экспрессии гена *rplL'-lacZ*. Уровень активности β -галактозидазы, кодируемой *rplL'-lacZ*, во всех случаях превосходит активность, обеспечиваемую *rplJ'-lacZ*. В отличие от *rplJ'-lacZ* с увеличением длины фрагмента *rplL* активность кодируемой им β -галактозидазы не уменьшалась. Транскрипция гибридных генов с промотора P_{β} сохранила превосходство уровня экспрессии *rplL'-lacZ*. Предполагается, что регуляция активности генов *rplJL* оперона *E. coli*, обеспечивающая избыточный синтез белка *L7/L12*, может осуществляться на уровне трансляции бицистронной мРНК *rplJL*.

Введение. Гены *rplKALL*, *rpoBC*, расположенные в *rif*-области на 88-й минуте хромосомы *E. coli*, программируют синтез рибосомных белков *L11*, *L1*, *L10* и *L7/L12* (последний из них присутствует в рибосоме в 4-кратном молярном избытке по отношению ко всем остальным белкам) [1, 2], а также β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*. В отношении регуляции экспрессии данных генов на уровне транскрипции и трансляции из литературы известно следующее. В инициации транскрипции генов *rplKALL* принимают участие два основных промотора — P_{L11} , иницирующий наиболее обильный в опероне тетрацистронный транскрипт генов *rplKALL* и бицистронный транскрипт *rplKA*, и промотор P_{L10} , иницирующий бицистронный транскрипт *rplJL* [3]. В силу так называемой промоторной окклюзии P_{L10} не проявляет максимальной эффективности в присутствии P_{L11} [4, 5]. Интергенная область оперона *rplJL* содержит также минорный промотор P_{L12} , функция которого *in vivo* окончательно не выяснена. Из данных по конструированию рекомбинантных плазмид для тестирования промоторов известно, что сила промоторов P_{L11} , P_{L10} , P_{L12} соотносится как 1,5 : 1 : 0,05 [6, 7], и установлено наличие минорных промоторов P_{β} и $P_{\beta'}$ перед генами *rpoB* и *rpoC*, кодирующих синтез β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*. Присутствие дополнительного промотора перед геном *rplL* было причиной тщательного изучения возможности обеспечения им избыточного синтеза белка *L7/L12*. Активность P_{L12} была выявлена с помощью промотор-детекторных плазмид [8], однако S_1 -картирование не выявило инициации транскрипции в интергенной области интактного *rplJL*-оперона [3]. Для бицистронной мРНК *rplJL* было обнаружено наличие двух 5'-концов: от промотора P_{L10} и на 150 п.о. ниже него и высказано предположение о том, что второй 5'-конец образуется при процессинге мРНК, иницируемой промотором P_{L10} [3]. Гетерогенности 3'- и 5'-концов мРНК в областях, соответствующих структурным последовательностям генов *rplJ* и *rplL*, не обнаружено [3]. В отношении мРНК *L11* — *L1* известно, что трансляция дистального цистрона (*L1*) сопряжена с проксимальным, удаленным на шесть оснований [9].

Различный уровень экспрессии генов, кодируемых единой полицистронной мРНК, может контролироваться рядом механизмов. На уровне транскрипции таким регуляторным элементом может являться дополнительный промотор, на уровне трансляции — различная эффективность ее инициации (в силу большей эффективности инициаторной области) и элонгации (в результате различий во вторичной структуре и частоте встречаемости редких кодонов). Кроме того, разный уровень экспрессии может обуславливаться неодинаковой стабильностью отдельных цистронов мРНК. Известны также случаи участия природных антисмысловых РНК в регуляции уровня экспрессии отдельных генов. Для изучения механизмов, регулирующих экспрессию генов *rif*-области, на первом этапе исследования мы обратились к традиционному методу слияния отдельных фрагментов области с детекторным геном *lacZ*. В качестве векторной была использована плазмида *pNM481* [8], содержащая структурную последовательность гена *lacZ*, в которой 21 п. о. на 5'-конце заменена на полилинкерный участок. Восполнение гена *lacZ* с соблюдением его рамки считывания фрагментами чужеродной ДНК, сохраняющими сигналы инициации как транскрипции, так и трансляции (или только трансляции) для тестируемых генов, позволяет судить об уровне их экспрессии по активности β-галактозидазы, кодируемой гибридным геном *lacZ*. При отсутствии промотора перед геном, сливаемым с *lacZ*, транскрипция его обеспечивается слабым промотором P₄, что делает *pNM481* аналогом специальных векторных плазмид, предназначенных для сравнения и измерения эффективности сигналов инициации трансляции.

Материалы и методы. Плазмиды. Для клонирования фрагментов *rplJL*-оперона *E. coli* использована плазмида *pNM481* [8].

Бактериальные штаммы. В качестве реципиентных применяли штаммы *E. coli* K12: JM101 (*supE*, *thi*, Δ(*lac-rpoAB*)/F' *traD36*, *proAB*, *lacI^qΔN15*) [10], MC1061 (*araD139*, Δ(*ara*, *leu*)7697, Δ*lac74*, *galU*, *hsdR*, *rpsL*) [8], TG1 (Δ(*lac-pro*), *supE*, *thi*, *hsdD5*/F' *traD36*, *proAB*, *lacI^q*, *lacZΔM15*) [8]. В качестве контроля при изменении активности β-галактозидазы использовали штаммы *E. coli* K802 (*hsdR⁺*, *hsdM⁺*, *gal⁻*, *met⁻*, *sup E*) [11] и AB259 *Hfr*, любезно предоставленные С. И. Черных (ИМБиг АН УССР).

Препараты ферментов. В работе также использованы эндонуклеазы рестрикции: *EcoRI*, выделенная и любезно предоставленная Э. Ким (Ин-т молекуляр. биологии и генетики (ИМБиг) АН УССР); *FokI*, *RsaI*, *VspI*, *HinI* производства НИО «Вектор» (Бердск); *NruI* фирмы «Boehringer» (ФРГ); *AluI*, *BamHI*, *BspRI*, *Cfr9I*, *EcoI051*, *HinII*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SalGI*, *SmaI* НПО «Фермент» (Вильнюс); ДНК-лигаза фага T4, выделенная в ИМБиг АН УССР, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и нуклеаза S₁ (НПО «Вектор», Бердск).

Ферментативные обработки и анализ фрагментов ДНК. При обработке соблюдали условия, рекомендуемые НИО «Фермент» (Вильнюс). Достижения одноцепочечных концов с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, трансформация бактериальных клеток плазмидной ДНК, получение плазмидной ДНК, электрофоретическое разделение ДНК в агарозных и полиакриламидных гелях и выделение фрагментов ДНК из гелей проводили по общепринятым методикам, описанным в руководстве Маннатица и др. [11], без существенных изменений.

Конструирование рекомбинантных плазмид. Фрагменты генов *rplI* и *rplL*, встраиваемые в *pNM481*, выделяли из рекомбинантных плазмид, сконструированных на основе плазмид *pUC* и описанных нами ранее [12, 13]. Первоначальным источником фрагментов ДНК генов *rplKALL* *E. coli* служила рекомбинантная плазмида *pJC703* [14].

Для встраивания фрагментов генов *rplI* и *rplL* в плазмиду *pNM481* ее предварительно расщепляли соответствующими рестриктазами с учетом рамки считывания гена *lacZ*. В случае необходимости правильная рамка считывания обеспечивалась достройкой концов фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Характеристика встраиваемых фрагментов приведена в таблице и на схеме конструирования рекомбинантных плазмид (рисунки). Наличие встроеного фрагмента обеспечивало экспрессию гена *lacZ*, т. е. проявление Lac⁺-фенотипа на среде, содержащей хромогенный субстрат

β -галактозидазы ZGal (5-бром-3-индолил- β -D-галактопиранозид). Использовали ZGal, синтезированный А. Г. Терентьевым (ИМБИГ АН УССР). В правильной ориентации встроеного фрагмента убеждались по локализации асимметричных сайтов расщепления определенными рестриктазами, известных из первичной последовательности генов *rplKALL* [15].

Селекцию рекомбинантных плазмид вели на среде LB [16], включавшей 50 мг/мл ампициллина отечественного производства и ZGal в концентрации 0,15 мг/мл.

Активность β -галактозидазы измеряли по методу Миллера [16] без существенных изменений. Использовали ОНФГ (*o*-нитрофенил- β -D-галактозид), синтезированный и любезно предоставленный А. Г. Терентьевым.

Характеристика рекомбинантных плазмид, обеспечивающих синтез гибридных β -галактозидаз

Characterization of recombinant plasmids, providing synthesis of hybrid β -galactosidases

| Плазмида | Ген, сливаемый с <i>lacZ</i> | Встроенный фрагмент | | | Активность β -галактозидазы относительно <i>rIK7</i> , % | |
|--------------|------------------------------|----------------------------------|-------------|--------------------|--|-----|
| | | Концевые сайты рестрикции | Промотор | Общая длина, п. о. | | |
| <i>rIK4</i> | <i>rplI</i> | <i>EcoRI-PstI</i> | P_{L10} | 914 | 75 | 150 |
| <i>rIK3</i> | <i>rplL</i> | <i>PstI-PstI</i> | P_{L12} | 646 | 156 | 100 |
| <i>rIK8</i> | <i>rplL</i> | <i>SmaI-PstI</i> | P_{L12} | 455 | 156 | 99 |
| <i>rIK9</i> | <i>rplL</i> | <i>HinII</i> | P_{L12} | 362 | 156 | 101 |
| | | (<i>AcyI</i>)- <i>PstI</i> | | | | |
| <i>rIK10</i> | <i>rplL</i> | <i>HindIII-PstI</i> | P_{L12} | 287 | 156 | 98 |
| <i>rIK12</i> | <i>rplL</i> | <i>BspRI-BspRI</i> | P_{L12} | 882 | 131 | 101 |
| <i>rIK20</i> | <i>rplL</i> | <i>AluI-AluI</i> | P_{L12} | 114 | 40 | 104 |
| <i>rIK7</i> | <i>rplL</i> | <i>Eco105I</i> | — | 190 | 156 | 100 |
| | | (<i>SnaBI</i>)- <i>PstI</i> | | | | |
| <i>rIK21</i> | <i>rplL</i> | <i>Eco105I</i> | — | 302 | 267 | 105 |
| | | (<i>SnaBI</i>)- <i>HinII</i> | | | | |
| <i>rIK14</i> | <i>rplI</i> | <i>BspRI-PstI</i> | — | 514 | 156 | 122 |
| <i>rIK18</i> | <i>rplL</i> | <i>PstI-PstI</i> | — | 252 | 156 | 110 |
| <i>rIK13</i> | <i>rplI</i> | <i>BspRI-PstI</i> | — | 262 | 75 | 49 |
| <i>rIK16</i> | <i>rplI</i> | <i>FokI-PstI</i> | — | 106 | 75 | 44 |
| <i>rIK23</i> | <i>rplI</i> | <i>BspRI-NruI</i> | — | 325 | 137 | 33 |
| <i>rIK22</i> | <i>rplI</i> | <i>BspRI-RsaI</i> | — | 385 | 198 | 14 |
| <i>rIK11</i> | <i>rplI</i> | <i>BspRI-SmaI</i> | — | 453 | 266 | 13 |
| <i>rIK5</i> | <i>rplI</i> | <i>FokI-SmaI</i> | — | 297 | 266 | 9 |
| <i>rIK27</i> | <i>rplI</i> | <i>rIK5+</i> | P_{β} | 1344 | 266 | 40 |
| | | -(<i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i>) | | | | |
| <i>rIK28</i> | <i>rplI</i> | <i>rIK5+</i> | — | 1352 | 266 | 6 |
| | | -(<i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i>) | | | | |
| <i>rIK29</i> | <i>rplL</i> | <i>rIK7+</i> | P_{β} | 1232 | 156 | 150 |
| | | -(<i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i>) | | | | |
| <i>rIK30</i> | <i>rplL</i> | <i>rIK7+</i> | — | 1232 | 156 | 120 |
| | | +(<i>EcoRI</i> - <i>EcoRI</i>) | | | | |
| <i>rIK31</i> | <i>rplL</i> | <i>rIK7+</i> | — | 400 | 366 | 46 |
| | | +(<i>PstI</i> - <i>PstI</i>) | | | | |

Результаты и обсуждение. Конструирование гибридных генов *lacZ* с помощью плазмиды *rNM48I*, описанное ранее [17], показало, что *rNM48I* благодаря наличию промотора P_4 может быть использована для сравнения эффективности сигналов инициации трансляции путем слияния 5'-концов изучаемых фрагментов с детекторным геном *lacZ*. Удобство гена *lacZ* в качестве репортерного заключается в простоте селекции рекомбинантных клонов *E. coli* по *Lac*⁺-фенотипу, выявленному с помощью хромогенного субстрата β -галактозидазы — ZGal, — а также в возможности оценки экспрессии гибридных генов по активности кодируемой ими β -галактозидазы. Слияние оперона с геном *lacZ* приводит к тому, что уровень синтеза β -галактозидазы изменяется под

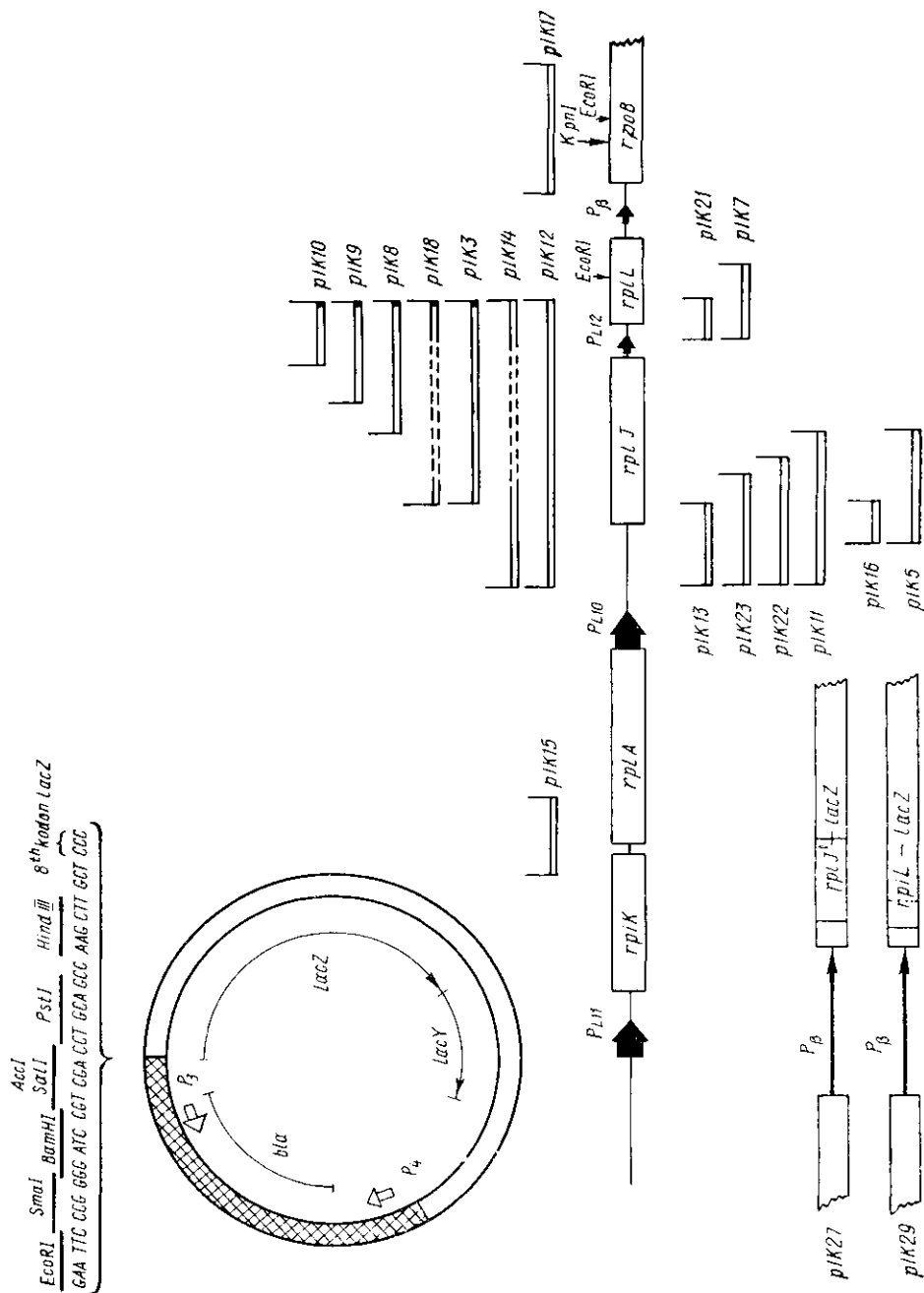


Схема конструирования рекомбинантных плазмид, содержащих гибридные гены *rplJ'*-*lacZ* и *rplL'*-*lacZ*. Двойными линиями показаны 5'-концевые фрагменты, встроенные в векторную плазмиду *pNM481* [8] (физико-генетическая карта приведена слева). Двойной прерывистой линией показана делеция *NruI-SnaBI* (*Eco1051*) (*pIK14*, *pIK18*). В случае необходимости (для совпадения рамки считывания встраиваемых фрагментов и гена *lacZ* *pNM481*) в *pIK10*, *pIK9*, *pIK8*, *pIK18*, *pIK3* встроенные фрагменты сохраняют участки полилинкерной области плазмид-источников [12, 13]

Schematic presentation of the hybrid *rplJ'*-*lacZ* and *rplL'*-*lacZ* containing recombinant plasmids. 5'-terminal fragments inserted into the *pNM481* plasmid (shown in the left upper corner) are indicated by duplicate lines. Broken line shows the *NruI-SnaBI* (*Eco1051*) generated deletion in *pIK14* and *pIK18*. To make in-frame fusions to *lacZ* gene, portions of the parental recombinant plasmid polylinker areas were restored on fragments used for *pIK10*, *pIK9*, *pIK8*, *pIK18* and *pIK3* construction

действием исследуемого регуляторного элемента оперона, в нашем случае — *rplKAIL*. Соединение же 5'-концевого фрагмента чужеродного гена с лишенным собственного сайта инициации трансляции геном *lacZ* векторной плазмиды (белковое слияние) помещает последний под контроль области инициации трансляции исследуемого. Таким образом, комбинация оперонного и белкового слияния делает возможным определение степени регуляции экспрессии β -галактозидазы, т. е. достигается определенный уровень ее экспрессии на транскрипционном или трансляционном уровнях.

Слиянием с *lacZ*-геном 5'-концевых фрагментов генов *rplJ* и *rplL* с сохранением собственных промоторов P_{L10} и P_{L12} (плазмиды *pIK4* и *pIK3*) мы определили, что уровни активности гибридных β -галактозидаз соответствуют 150 и 100 ед. Миллера [16]. Учитывая соотношение силы промоторов P_{L10} и P_{L12} 100:8 [7], высокий уровень экспрессии гена *rplL'-lacZ* мог быть результатом, в частности, более эффективной трансляции гена *rplL'-lacZ*.

Известно, что в отличие от всех остальных рибосомных белков *E. coli* L7/L12, кодируемый геном *rplL*, синтезируется в 4-кратном избытке. Поэтому в центре внимания данного исследования было изучение механизмов регуляции экспрессии генов *rplJL* с помощью техники белкового слияния. Для выделения фрагментов генов, клонируемых в *pNM481*, использовали расщепление эндонуклеазами рестрикции по сайтам, расположенным в интактном опероне *rplKAIL* *E. coli*, а также удлинение фрагментов за счет полилинкерных областей рекомбинантных плазмид — их источников, что обеспечивало необходимую для слияния с *lacZ* рамку считывания 5'-концевого фрагмента. Общая схема конструирования плазмид и результаты измерения активности β -галактозидаз, кодируемых гибридными генами, приведены на рисунке и в таблице.

Ранее мы показали [17], что при транскрипции с промотора P_4 векторной плазмиды *pNM481* активность β -галактозидазы, обеспечиваемая геном *rplL'-lacZ* (*pIK7*), значительно превосходит таковую для *rplJ'-lacZ* (*pIK5*). Естественно, что это превосходство в экспрессии в силу используемого метода конструирования гибридных генов *lacZ* могло быть обусловлено рядом факторов, в частности, разной стабильностью мРНК и гибридных β -галактозидаз, а также возникновением нового промотора в результате клонирования. Поэтому в ходе дальнейшего исследования мы считали целесообразным провести соответствующие дополнительные эксперименты, в том числе: а) исключить возможность того, что высокий уровень экспрессии гена *rplL'-lacZ* (*pIK7*) связан с образованием в *pNM481* в результате встраивания чужеродной ДНК «случайного» промотора, транскрипция с которого обеспечила высокий уровень экспрессии гибридного гена; б) убедиться в том, что разный уровень экспрессии генов *rplJ'-lacZ* и *rplL'-lacZ* не является следствием разной копийности содержащих их рекомбинантных плазмид.

Экспериментально показано сохранение активности гибридных β -галактозидаз при замене восьми N-концевых аминокислотных остатков и очень протяженными чужеродными полипептидными последовательностями [18, 19]. Однако стабильность таких белков может значительно отличаться от нативного. Поэтому следовало исключить возможность того, что разная активность β -галактозидаз, кодируемых *rplJ'-lacZ* и *rplL'-lacZ*, обусловлена меньшей стабильностью первого.

Мы считали целесообразным также сравнить уровни экспрессии генов *rplJ'-lacZ* и *rplL'-lacZ* при транскрипции их с промотора, отличного от P_4 , что позволило бы выявить возможное специфическое влияние структуры гибридной мРНК.

Рассматривая возможность образования нового промотора (в месте лигирования *SnaBI*-конца фрагмента *rplL* в *pIK7* и *pIK21*), эффективно транскрибирующего ген *rplL-lacZ*, мы обратились к анализу первичной последовательности полилинкерной области *pNM481* [8] и встроенного фрагмента [15]. Можно было предположить, что при лигировании *SmaI*-конца *pNM481* с *Eco1051* (*SnaBI*)-концом встраивает-

мого фрагмента *rplL* последовательность ССС GTATAA TTCAGGAACAATTТАААТG (на 31 п. о. левее АТG-кодона гена *rplL*) в силу большой гомологии с «-10»-областью среднестатистического промотора рибосомных белков *E. coli* [1] могла стать «-10»-областью «случайного» промотора перед геном *rplL'-lacZ*. Учитывая, что изменение расстояния между «-35»- и «-10»-областями любого промотора сказывается на его эффективности и, следовательно, должно отразиться на уровне экспрессии контролируемого им гена. Для увеличения расстояния между «-35»- и «-10»-областями предполагаемого новообразованного промотора в данную область было введено 4 п. о. Для этого плазмиду *pIK7* расщепляли по уникальному сайту *EcoRI*, расположенному на 7 п. о. выше места сочленения *SmaI-Eco1051*-концов, и после достройки фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* подвергали лигированию. О правильном восполнении и последующем лигировании *EcoRI*-концов свидетельствовало возникновение сайта расщепления рестриктазы *VspI*, узнающей последовательность АТТААТ. Уровни активности β-галактозидазы, кодируемой геном *rplL'-lacZ pIK7*, до и после введения 4 п. о. в сайт *EcoRI* были одинаковы, свидетельствуя, таким образом, об отсутствии «новообразованного» промотора. Помимо этого, последовательность выше «-10»-области предполагаемого промотора изменялась также и в результате введения делеции $\Delta NruI-SnaBI$ (*Eco1051*) (*pIK4*, *pIK18*), которая не снижала уровня экспрессии гена *rplL'-lacZ* (таблица). Таким образом, причина превосходства активности β-галактозидазы, кодируемой генами *rplL'-lacZ*, не связана с образованием дополнительного промотора.

Сравнение термостабильности гибридных β-галактозидаз, кодируемых генами *rplI'-lacZ* (*pIK13* и *pIK11*) и *rplL'-lacZ* (*pIK20*, *pIK7*), по методу [20] обнаружило, что уже при 37 °С стабильность гибридных белков значительно ниже, чем у нативной β-галактозидазы, кодируемой геном *lacZ*, хромосомы в штаммах *E. coli* *K12 K802* (*hsdR+*, *hsdM+*, *gat-*, *met-*, *supE*). Однако стабильность гибридной β-галактозидазы для генов *rplI'-lacZ* не была ниже, чем для *rplL'-lacZ*, и, следовательно, не явилась причиной более низкого уровня экспрессии.

Активность β-галактозидазы, кодируемой гибридным геном, может зависеть от штамма-реципиента [21]. В нашем случае, однако, измерение активности β-галактозидаз при культивировании сконструированных плазмид в штаммах *E. coli* *TG-1*, *MC1061* и *JM101*, дефектных по гену *lacZ*, не выявило отличий. Не наблюдалось также различия в копийности рекомбинантных плазмид, которое могло бы стать причиной разного уровня β-галактозидазной активности, обеспечиваемой генами *rplI'-lacZ* и *rplL'-lacZ*.

Помимо вышеперечисленного мы считали целесообразным сравнить уровни экспрессии генов *rplI'-lacZ* и *rplL'-lacZ* при транскрипции их с промотора, отличного от P_4 . Учитывая слабую силу промотора P_4 по отношению, например, к P_{L10} (сравнить *pIK4* и *pIK5*, см. таблицу), для встраивания в *pIK5* и *pIK7* был использован минорный промотор *rhoBC*-оперона *E. coli* P_β . Транскрипция генов *rplI'-lacZ* и *rplL'-lacZ* с P_β повысила уровень экспрессии обоих генов, сохранила превосходство экспрессии гена *rplL'-lacZ*, которое, однако, стало менее значительным. Известно, что наиболее достоверную разницу в экспрессии гена удается регистрировать при единственной его копии [20, 22]. Так, например, присутствие *Rep*-последовательности в гене *malE* хромосомы снижает уровень его экспрессии в 9 раз, в случае же нахождения гена *malE* на плазмиде — в 2—3 раза [22]. В силу этого можно предположить, что превосходство гена *rplL'-lacZ* (*pIK29*) стало менее заметным в результате повышения экспрессии обоих гибридных генов (*pIK27* и *pIK29*), обеспечиваемом транскрипцией с более сильного промотора P_β .

Предварительные результаты слияния с геном *lacZ* 5'-концевых фрагментов генов *rplI* и *rplL* [17] свидетельствуют о том, что одним из механизмов регуляции более высокого уровня экспрессии гена *rplL* в интактном опероне *rplIL* *E. coli* может быть различная эффективность

трансляции цистронов *rplJ* и *rplL* в общей бицистронной матрице. Если бы различие существовало уже на стадии инициации трансляции, можно было бы ожидать превосходства экспрессии гена *rplL'-lacZ* над *rplJ'-lacZ* при слиянии с геном *lacZ* рибосомосвязывающих участков данных генов. Мы предположили, что при низком уровне экспрессии гибридных генов, обеспечиваемом транскрипцией с очень слабого промотора P_4 путем удлинения сливаемого с *lacZ* 5'-концевого фрагмента, можно было бы зарегистрировать различный уровень экспрессии гибридных генов, если бы он контролировался неодинаковой эффективностью элонгации трансляции.

Для проверки этого предположения мы клонировали в *pNM48I* фрагменты генов *rplJ* и *rplL* различной протяженности. Наши результаты (таблица) свидетельствуют о том, что общая протяженность встраиваемого фрагмента ДНК не влияет на эффективность экспрессии гибридного гена (активность β -галактозидазы). Это согласуется с данными Лумана и др. [23], полученными при сравнении эффективности областей инициации трансляции ряда генов, проведенном с помощью плазмиды *pKL203* [23]. В то же время изменение протяженности 5'-концевых фрагментов генов *rplJ* и *rplL*, присоединяемых к гену *lacZ*, позволило выявить следующую закономерность. Увеличение с 60 до 266 п. о. фрагмента гена *rplL* (плазмиды *pIK20*, *pIK7*, *pIK21*) не привело к существенному изменению уровня активности кодируемой геном β -галактозидазы. В случае же гена *rplJ'-lacZ* — снижало активность кодируемых β -галактозидаз. Последовательное увеличение фрагмента гена *rplJ* от сайта узнавания *PstI* (*pIK16*) до *SmaI* (*pIK5*) снизило уровень активности кодируемой гибридной β -галактозидазы в 5 раз. Данные исследования показали, что снижение активности не обусловлено падением стабильности гибридной β -галактозидазы. Для изучения влияния указанной области гена *rplJ* она была выделена из *pIK5* в виде *PstI-PstI*-фрагмента и встроена в *pIK7* в сайт лигирования *rplL'*- и *lacZ*-фрагментов гибридного гена с сохранением сквозной рамки считывания. Выяснилось, что встраивание этого фрагмента привело к снижению активности β -галактозидазы, кодируемой *pIK31*, в 2,2 раза по сравнению с *pIK7*. Уменьшение экспрессии гена *rplL'-lacZ* под влиянием указанного фрагмента гена *rplJ* могло быть вызвано иными факторами, которые исследуются в настоящее время. Возможно, однако, что указанная область гена *rplJ* участвует в регуляции его экспрессии в интактном опероне *rplJL E. coli*, дифференцируя уровень синтеза белков *L10* и *L7/L12*.

Интергенная область оперона *rplJL* содержит минорный промотор P_{L12} , активность которого показана при клонировании в промотор-детекторные плазмиды [24], однако не выявлена с помощью S_1 -картирования [3]. Известно, что основной промотор оперона *rplJL* — P_{L10} — не проявляет максимальной эффективности в присутствии вышележащего сильного промотора P_{L11} . Известны также факты [25, 26] влияния окружающих промотор последовательностей на проявляемую им силу. Слияние с *lacZ* фрагментов гена *rplL*, сохраняющих промотор P_{L12} , фланкированный последовательностями различной протяженности (*pIK8*, *pIK9*, *pIK10*, *pIK12*, *pIK13*), не повлияло на уровень экспрессии гена *rplL'-lacZ* и, следовательно, на эффективность промотора P_{L12} . Различная протяженность последовательностей, фланкирующих промотор P_{L12} во фрагментах с 5'-концом *rplL*, сливаемого с *lacZ*, не изменяла уровня экспрессии гена *rplL'-lacZ*, что указывает на отсутствие влияния вышележащей области на эффективность промотора P_{L12} . Удаление промотора P_{L12} в *pIK7*, делеция участка $\Delta Nrul-Eco1051$ (*pIK14*, *pIK18*) также не оказали заметного эффекта.

В отношении гена *rplJ E. coli* показано [27], что мутации, влияющие на эффективность трансляции мРНК *rplJ*, сосредоточены в области 70—195 основаниями выше АТГ-кодона.

В сконструированных нами гибридных генах *rplJ'-lacZ* делеция *BspRI-FokI*-участка приводила к снижению экспрессии гибридных ге-

нов (*pIK16* по сравнению с *pIK13* и *pIK15* по сравнению с *pIK11*). Таким образом, *BspRI-FokI*-участок от 106 до 261 основания выше АТГ содержит области, необходимые для оптимальной экспрессии гена *rplJ*.

По аналогии с этим можно было предположить, что области, находящиеся выше рибосомосвязывающего сайта гена *rplL*, участвуют в определении эффективности трансляции его мРНК. Сравнение уровня экспрессии гена *rplL'-lacZ* в *pIK3*, *pIK8*, *pIK9*, *pIK10*, *pIK12*, *pIK20* и *pIK7*, где область, расположенная выше SD *rplL*, последовательно делегируется, не выявляет закономерностей, аналогичных эффекту присутствия *BspRI-FokI*-участка перед геном *rplJ*. Плазмида *pIK14* с делецией $\Delta NruI-Eco105I$ обеспечивала больший уровень экспрессии гена *rplL'-lacZ* по сравнению с *pIK7*, что, по-видимому, явилось следствием сохранения SD-области гена *rplJ*, принимающей участие в инициации трансляции гибридной мРНК. По аналогии с вышеописанным эффектом можно было предположить, что последовательности, окружающие рибосомосвязывающий сайт мРНК, также влияют на эффективность трансляции. Систематическое дестерминирование участков выше 5'-конца *rplL* (*pIK3*, *pIK8*, *pIK9*, *pIK10*, *pIK12*, *pIK20* и *pIK7*) не выявило закономерного влияния. Однако делеция $\Delta NruI-SnaBI$ увеличила уровень экспрессии *rplL-lacZ* в *pIK14* по сравнению с *pIK12* и *pIK18* по сравнению с *pIK3*. Природа этого эффекта в настоящее время неясна.

Известно, что трансляция цистронов *L11* и *L1* в мРНК *L11-L1* сопряжена. Слияние гена *rplA* с *lacZ* (*pIK15*) показало, что *rplA* обладает достаточно эффективным рибосомосвязывающим участком, который, однако, маскируется вторичной структурой в бицистронной матрице, препятствуя самостоятельной инициации в самом цистроне [28, 29].

В отличие от мРНК *L11-L1*, где цистроны разделены тремя основаниями, трансляция обоих цистронов также сопряжена, но происходит последовательно, приводя, однако, к 4-кратному избытку синтеза белка *L7/L12*.

По результатам S_1 -картирования, стабильность обоих цистронов мРНК *rplJL* одинакова и, следовательно, не определяет различного уровня синтеза *L10* и *L7/L12*. Еще одним механизмом контроля экспрессии в прокариотических организмах является регуляция антисмысловой РНК.

Установив возможность снижения экспрессии гена *rplJ* антисмысловой РНК в большом молярном избытке по отношению к смысловой, мы исследовали возможность такой регуляции в *rplJL*-опероне *E. coli*. Для этого с помощью клонирования фрагментов оперона *rplJL* проводили поиск сравнимого по силе с P_{L10} промотора, который мог бы инициировать синтез антисмысловой РНК *in vivo*. Встраиванием *BspRI-BspRI*-фрагмента и его субфрагментов, полученных расщеплением рестриктазами *SmaI*, *DraI*, *RsaI*, *NruI*, мы не обнаружили в антисмысловой *rplJ* ориентации промотора, сравнимого по силе с P_{L10} .

Таким образом, закономерно предположить, что одним из наиболее вероятных механизмов контроля экспрессии генов *rplJL* является разная эффективность трансляции.

При сравнении гибридных генов *rplJ'-lacZ* и *rplL'-lacZ*, транскрибируемых с промотора P_4 , проявилось преимущество экспрессии второго, увеличивающееся с удлинением фрагментов, соединяемых с *lacZ*.

Сопоставление первичной структуры рибосомосвязывающих участков *rplJ* и *rplL* с параметрами, оптимальными для экспрессии [30], не выявило очевидных преимуществ какого-либо из них. В силу этого можно предположить, что, если механизмом дифференциации экспрессии генов *rplJ* и *rplL* в интактном опероне *E. coli* является разная эффективность трансляции, причиной ее могут быть особенности вторичной структуры мРНК.

Авторы выражают искреннюю благодарность А. В. Ельской за обсуждение результатов работы и ценные замечания.

CONSTRUCTION OF HYBRID LACZ GENES TO STUDY THE E. COLI RPLJL OPERON GENES EXPRESSION MECHANISMS

I. V. Kroupskaya, A. N. Zhyvoloup, E. B. Paton

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

Summary

Using the *pNM481* plasmid vector 5'-terminal fragments of *rplJ* and *rplL* genes were fused in-frame to gene *lacZ*. Hybrid β -galactosidases activity, encoded by genes *rplJ'*-*lacZ* and *rplL'*-*lacZ* was compared. In contrast to *rplL'*-*lacZ*, extension of *rplJ* fused portion resulted in the decrease of the β -gal activity level. Different efficiency of translational seems to be the most probable mechanism, providing the excess synthesis of r-protein L7/L12 in vivo.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindahl L., Zengel J. M. Ribosomal genes in *Escherichia coli* // Ann. Rev. Genet.— 1986.— 20, P. 297—326.
2. Nomura M., Gourse R., Baughman G. Regulation of the synthesis of ribosomes and reboosomal components // Ann. Rev. Biochem.— 1984.— 53.— P. 75—118.
3. Downing W. L., Dennis P. P. Transcription products from the *rplKAL-rpoBC* gene cluster // J. Mol. Biol.— 1987.— 194, N 4.— P. 609—620.
4. Morgan B. A., 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, Inc., 1985.— P. 31—40.
5. Jinks-Robertson S., Nomura M. Ribosomes and tRNA // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology.— New York: Amer. Soc. Microbiol., 1987.— Vol. 2.— P. 1358—1385.
6. An G., Friesen J. Characterization of promoter-cloning plasmids analysis of operon structure in the *rij* region *Escherichia coli* and isolation of an enhanced internal promoter mutant // J. Bacteriol.— 1980.— 144, N 3.— P. 904—916.
7. Ralling G., Linn T. Relative activities of the transcriptional regulatory sites in the *rplKAL-rpoBC* gene cluster of *Escherichia coli* // Ibid.— 1984.— 158, N 10.— P. 4922—4926.
8. Minton N. P. Improved plasmid vectors for isolation of transcriptional *lac* gene fusions // Gene.— 1984.— 31, N 2.— P. 269—273.
9. Baughman G., Nomura M. Localization of the target site for translation regulation of the *L11* operon and direct evidence for translational coupling in *Escherichia coli* // Cell.— 1983.— 34, N 3.— P. 979—988.
10. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: sequences nucleotide of the *M13mp18* and *pUC19* vectors // Gene.— 1985.— 33, N 1.— P. 103—119.
11. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 477 с.
12. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Однонаправленная ориентация при клонировании фрагментов *rplKAL-rpoBC*-оперона *Escherichia coli* в многокопийной плазмиде *pUC* // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 1.— С. 58—66.
13. Патон Е. Б., Живолуп А. Н., Вараница Л. А. Присутствие двух сильных промоторов определяет ориентацию фрагмента ДНК при встраивании в плазмиду *pUC19* // Там же.— 1986.— 2, № 4.— С. 217—219.
14. Collins J. Deletions, insertion and rearrangement affecting *rpoB* gene expression // Mol. and Gen. Genet.— 1979.— 173, N 1.— P. 217—220.
15. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA-polymerase subunit in *Escherichia coli* / L. F. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura, H. Lewis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1979.— 76, N 4.— P. 1697—1701.
16. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
17. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Изучение регуляции экспрессии гена *rplL* *Escherichia coli* методом слияния с геном *lacZ* в плазмиде *pNM481* // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 99—102.
18. Conversion of β -galactosidase to a membrane-bound state by gene fision / T. J. Silhavy, M. J. Casadaban, H. A. Shuman, J. R. Beckwith // Proc. Nat. Acad. Ssi. USA.— 1976.— 73, N 10.— P. 3423—3427.
19. Close T. J., Christman J. L., Rodrigues R. L. M13 bacteriophage and *pUC* plasmids containing DNA insert but still capable of β -galactosidase α -complementation // Gene.— 1983.— 23, N 1.— P. 131—136.
20. Effects of heterologous ribosomal binding sites on the transcription and translation of the *lacZ* gene of *Escherichia coli* // Ibid.— 1985.— 37, N 1.— P. 145—154.
21. Iborra F., Rayanal A., Guerineau N. The promoter of the β -glucosidase gene from *Kluyveromyces fragilis* contains sequences that act as upstream repressing sequences

- in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. and Gen. Genet.— 1988.— 213, N 4.— P. 150—154.
22. Newbury S. F., Smith N. H., Higgins C. F. Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon // Cell.— 1987.— 51, N 7.— P. 1131—1143.
 23. Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli* / A. C. Looman, J. Bodlaender, M. de Gruyter et al. // Nucl. Acids Res.— 1986.— 14, N 13.— P. 5481—5497.
 24. Крупская И. В., Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Внутренний промотор *rplJL*-оперона *Escherichia coli* проявляет высокую эффективность в рекомбинантной плазмиде *pNM481* // Генетика.— 1989.— 25, № 1.— С. 154—157.
 25. Kuhlmeier C., Fluhr R., Chua N.-H. Upstream sequences determine the difference in transcript abundance of pea *rpcS* genes // Mol. and Gen. Genet.— 1988.— 212, N 4.— P. 405—411.
 26. Iborra F., Francingues M.-C., Guérineau M. Localization of the upstream regulatory sites of yeast iso2-cytochrome *S* gene // Ibid.— 1985.— 199, N 2.— P. 117—122.
 27. Friesen J. D., Tropak M., An G. Mutation in the *rplJ* leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // Cell.— 1983.— 32, N 2.— P. 361—369.
 28. Gouy M., Gautier C. Codon usage in bacteria: correlation with gene expression // Nucl. Acids Res.— 1982.— 10, N 25.— P. 7055—7074.
 29. Sharp P. M., Li W.-H. Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for «rare» codons // Ibid.— 1986.— 14, N 19.— P. 7737—7749.
 30. Tinoco I., Uhlenbeck O. C., Levine M. D. Estimation of secondary structure in ribonucleic acids // Nature.— 1971.— 230.— P. 362—367.

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

Получено 04.06.89

УДК 579.25.4.2.862.1:637.136.5

Л. М. Румер, В. А. Лившиц

ТРАНСФОРМАЦИЯ СФЕРОПЛАСТОВ *STREPTOCOCCUS LACTIS* ПЛАЗМИДАМИ

Определены оптимальные условия получения трансформабельных сферопластов *S. lactis* с помощью лизоцима. Установлено, что жизнеспособность клеток *S. lactis* быстро падает с увеличением концентрации лизоцима и времени инкубации с ним.

Осуществлена трансформация сферопластов чужеродными гетерологичными плазмидами *pRT84* и *pLF2*. Показана экспрессия в клетках *S. lactis* гена *Bacillus amyloliquefaciens*, кодирующего α -амилазу, клонированного в составе *pRT84*.

Введение. Молочные стрептококки широко используются в производстве кисломолочных продуктов и в сыроделии. Некоторые штаммы *S. lactis* являются продуцентами пептидного антибиотика низина, который применяется в качестве консерванта в пищевой промышленности. Трансформация молочных стрептококков плазмидами является важной предпосылкой для их генетического изучения и применения методов генной инженерии в селекционной работе с ними.

В последние годы описано получение протопластов *S. lactis* и трансформация их как собственными, так и некоторыми чужеродными плазмидами [1—10]. В этих работах для удаления клеточной стенки использовали лизоцим из яичного белка, мутанолизин (N-ацетилмурамидазу из *Streptomyces globisporus*) или их комбинацию, а также осуществляли дополнительную обработку клеток протеолитическими ферментами и определенными препаратами α -амилазы [2—4]. Однако описанные методики плохо воспроизводятся в различных лабораториях [11]. Причины, влияющие на эффективность трансформации протопластов *S. lactis* плазмидами, до сих пор слабо изучены. Следует также отметить, что применение мутанолизина для растворения клеточной стенки у молочнокислых бактерий ограничено малодоступностью этого препарата.

Целью настоящей работы является определение оптимальных условий получения трансформабельных сферопластов *S. lactis* с помощью лизоцима. Кроме того, интересно было изучить возможность поддержания в клетках молочных стрептококков некоторых чужеродных плазмид, перспективных для использования их в качестве векторов при молекулярном клонировании.