

Роль аденина (A₁₅₈₃) сайта-мишени рибосомного белка *L10* на мРНК критична для аутогенной регуляции экспрессии гена *rplJ* *Escherichia coli*

М. Н. Радионова, Е. Б. Патон

Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной Академии Наук Украины
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина

Роль A₁₅₈₃ сайта-мишени на мРНК рибосомного белка L10 в аутогенном контроле экспрессии rplJ-гена E. coli проверена заменой A₁₅₈₃→G. С помощью тестирования in vivo доказана значимость A₁₅₈₃ в осуществлении контроля экспрессии rplJ-гена.

Экспрессия гена *rplJ* *E. coli*, кодирующего рибосомный (р-) белок *L10*, регулируется аутогенно на уровне трансляции [1]. Аутогенный контроль экспрессии *rplJ*-гена обеспечивается способностью р-белка *L10* конкурентно связываться с сайтами-мишенями на матричной (м-) и рибосомной (р-) РНК. Проведенное нами сравнение показало, что не только у энтеробактерий, но и у филогенетически удаленных от них прокариотических организмов для структурной организации м- и рРНК сайтов-мишеней р-белка *L10* характерна ярко выраженная гомология вторичной структуры [2].

«Консенсус» сайта-мишени белка *L10* на мРНК, выведенный нами для семи представителей энтеробактерий, *Thermotoga maritima* и *Synechocystis* sp. 6803, позволил обнаружить структурные элементы, консервативные для м- и рРНК мишеней *L10* белка соответствующих прокариотических организмов [3]. Помимо AGA мотива, расположенного во внутренней петле мРНК мишени, консервативным является элемент С-G, А (см. рисунок, а также [3]).

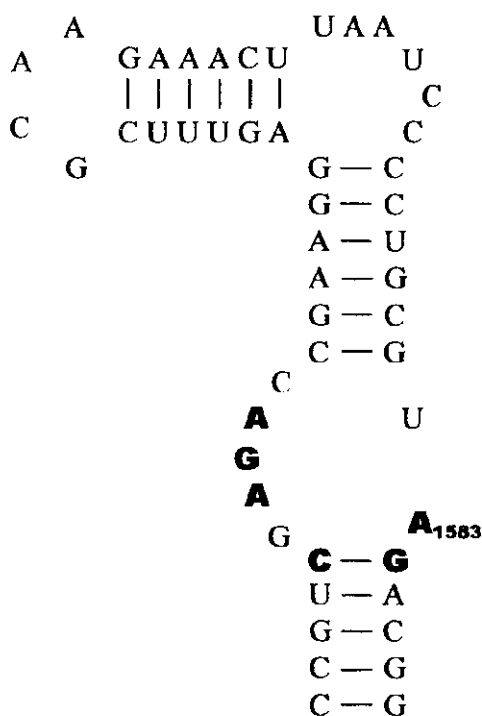
Проанализировав последовательности РНК большой субъединицы рибосомы (использована ба-

за данных NCBI — National Center of Biotechnology Information, Bethesda, Maryland 20894, Building 38A, Room 8N805, www.ncbi.nlm.nih.gov), мы установили, что аналогом С-G, А элемента, характерного для мишеней *L10* белка на рРНК прокариот и архебактерий, у эукариот является U-A, А элемент. Обнаруженная нами абсолютная консервативность аденина С-G, А элемента (A₁₅₈₃, нумерация согласно нуклеотидной последовательности *E. coli* [4], рисунок) свидетельствует в пользу его исключительной значимости для взаимодействия белка *L10* с РНК.

Исходя из характерного для *E. coli* механизма ауторегуляции экспрессии *rplJ*-гена мы предположили, что консервативный A₁₅₈₃ мишени *L10* белка на мРНК важен также для осуществления данного механизма посредством взаимодействия с *L10* белком.

Для доказательства важности A₁₅₈₃ для аутогенной регуляции экспрессии гена *rplJ* *E. coli* нами проведен мутагенез, в результате которого A₁₅₈₃ заменен на G. Мутагенез проводили по стандартной методике [5] при помощи набора «Muta-Gene» («Bio-Rad Laboratories», США).

Для количественной оценки влияния полученной замены на эффективность ауторегуляции экспрессии гена *rplJ* *in vivo* использовали биоплазмидную систему, как описано нами ранее [2].



Вторичная структура мишени L10 белка *E. coli* на мРНК. AGA и C-G, A элементы, консервативные в м- и рРНК сайтах-мишенях р-белка L10 энтеробактерий, *Thermotoga maritima* и *Synechocystis sp. 6083* [3], выделены жирными буквами

В этой системе в качестве репортерной плазмиды, содержащей нативный *rplJ*-лидер *E. coli*, использовали плазмиду *pGA189* [6]. Фрагмент, содержащий *rplJ*-лидер с внесенной заменой, в виде *PstI*-кассеты был встроен в уникальный *PstI*-сайт векторной плазмиды *pGA200* [6]. Эффекторами служили плазмиды *pEP20-1*, кодирующая нативный L10 белок *E. coli*, и *pEP14*, обеспечивающая синтез белка L10 *E. coli* с делецией 22 аминокислотных остатков C-концевой области, приводящей к потере ауторегуляторной функции белка L10 [7]. Эффективность ауторегуляции «F/B» (feedback ratio) оценивали, как отношение активности β-галактозидазы, продуцируемой репортерной плазмидой под влиянием «эффекторов» *pEP14* и *pEP20-1* соответственно.

Активность β-галактозидаз, продуцируемых репортерными генами *rplJ'-lacZ*, измеряли по методике Миллера [8] без существенных изменений.

Для поддержания биплазмидных комбинаций использовали клетки *E. coli* K12 JF3029 [6].

Результаты тестирования уровня ауторегуляции экспрессии гена *rplJ* *in vivo* показали, что замена A₁₅₈₃ → G приводит к снижению значения F/B до 0,9. (F/B — отношение значений β-галактозидазной активности системы, содержащей в качестве «эффектора» *pEP14*, к значениям β-галактозидазной активности системы с «эффектором» *pEP20-1*.)

Следовательно, после внесения замены A₁₅₈₃ → G ауторегуляция экспрессии гена *rplJ*, основанная на взаимодействии рибосомного белка L10 с сайтом-мишенью на мРНК, полностью утрачивается. Эффект замены A₁₅₈₃ → G в сайте-мишени белка L10 на мРНК *E. coli* доказывает критичность роли A₁₅₈₃ для взаимодействия р-белка L10 с мРНК и опосредованной этим белком аутогенной регуляции экспрессии гена *rplJ* у *E. coli*. Консервативность A₁₅₈₃ во всех известных на сегодня сайтах связывания белка L10 с рРНК позволяет распространить вывод об исключительной значимости этого основания для взаимодействия L10 белка с рРНК не только прокариот, но также эукариот и архебактерий.

Авторы выражают благодарность В. К. Потапову (Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина—Ю. А. Овчинникова РАН) за качественный синтез олигонуклеотидов.

Данная работа проведена в рамках гранта UB1-303 совместного финансирования CRDF (Civilian Research and Development Foundation, США) и правительства Украины.

М. М. Радіонова, Є. В. Патон

Роль аденину (A₁₅₈₃) сайта-мишени рибосомного білка L10 на мРНК критична для аутогенної регуляції експресії гена *rplJ* *Escherichia coli*

Резюме

Роль A₁₅₈₃ як сайта-мішені на мРНК рибосомного білка L10 в аутогенному контролі експресії *rplJ*-гена *E. coli* перевірено заміною A₁₅₈₃ → G. За допомогою тестування *in vivo* доведено значення A₁₅₈₃ у здійсненні контролю експресії *rplJ*-гена.

M. N. Radionova, E. V. Paton

The role of A₁₅₈₃ in the mRNA target of the ribosomal protein L10 is critical for the autogenous control of the *Escherichia coli* *rplJ* gene expression

Summary

The role of A₁₅₈₃ in the mRNA target of the ribosomal protein L10 for the autogenous control of the *E. coli* *rplJ* gene expression was tested via an A₁₅₈₃ → G substitution. The *in vivo* test proved A₁₅₈₃ to be crucial for execution of the *rplJ* gene expression control.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Climie S. C., Friesen J. D.* Feedback regulation of the *rpIJL-rpoBC* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure // *J. Mol. Biol.*—1987.—198.—P. 371—381.
2. *Патон Е. Б., Живолуп А. Н.* Доказательство аутогенной регуляции экспрессии гена *rpIJ* у *Thermotoga maritima* и возможности перекрестной регуляции экспрессии по этому принципу между *T. maritima* и энтеробактериями // *Генетика.*—1997.—33, № 10.—С. 1341—1344.
3. *Живолуп А. Н., Патон Е. Б.* Общий механизм регуляции экспрессии в *rpIJL* опероне энтеробактерий подтверждается консервативностью структурной организации лидерной области мРНК. Регуляторный консенсус лидерной области мРНК *L10-L12* энтеробактерий // *Докл. АН РАН.*—1995.—340, № 1.—С. 104—107.
4. *Post L. E., Strycharz G. D., Nomura M., Lewis H., Dennis P. P.* Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit B in *E. coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76, N 4.—P. 1697—1701.
5. *Kunkel T. A., Roberts J. D., Zakour R. A.* Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis using phagemid vectors // *Meth. Enzymol.*—1987.—154.—P. 367—382.
6. *Friesen J. D., Tropak M., An G.* Mutations in the leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // *Cell.*—1983.—32, N 2.—P. 361—369.
7. *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.
8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—436 с.

УДК 577.21

Поступила в редакцию 15.03.99