



Геном и его регуляция

УДК 577.21

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

РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК L10 ESCHERICHIA COLI СПОСОБЕН РЕГУЛИРОВАТЬ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ rplJL SALMONELLA TYPHIMURIUM

После введения в клетки *S. typhimurium* при помощи усовершенствованной методики электропорации плазмид, обеспечивающих экспрессию рибосомных белков L10 *E. coli*, наблюдали эффекты замедления роста клеток и снижения копийности плазмид. Аналогичные явления обнаружены у клеток *E. coli*, что свидетельствовало о возможности регуляции генов *rplJL S. typhimurium* указанными белками.

Кластер генов рибосомных белков L11, L1, L10 и L7/L12 высококонсервативен по структурной и регуляторной организации у энтеробактерий [1], что делает возможным гетерологичную регуляцию экспрессии кодирующих их генов. В частности, высокая консервативность структуры [2] обуславливает способность белка L10 *S. typhimurium* управлять экспрессией генов *rplJL*-оперона *E. coli* [3].

Суперпродукция всех известных регуляторных рибосомных белков, в том числе и L10, оказывает негативный для нормальных клеток-хозяев эффект, выражающийся в подавлении или замедлении их роста и снижении копийности в них L10-экспрессирующих рекомбинантных плазмид [4]. Подобный эффект наблюдался при поддержании в клетках *E. coli* плазмид, обеспечивающих синтез L10 *S. typhimurium* [3]. Нас интересовало влияние суперпродукции регуляторного белка L10 *E. coli* на клетки *S. typhimurium*. Ввести в клетки *S. typhimurium* L10-продуцирующие плазмиды стандартными методами [5, 6] нам не удавалось, поэтому разработка эффективного метода введения плазмидной ДНК в этот организм (и, возможно, в другие энтеробактерии) представляла самостоятельный интерес.

Успешной для трансформации клеток *S. typhimurium* оказалась методика электропорации. Ее осуществляли на плоскопараллельных алюминиевых электродах за счет разряда конденсаторной батареи емкостью 5 мкФ, напряженностью электрического поля 21 кВ/см. В качестве клеток-хозяев использовали любезно предоставленный д-ром К. Сандерсоном из *Salmonella Genetic Stock Centre* (Канада) стрептомицинустойчивый штамм *S. typhimurium* LT2 LB5010 (*metA22 metE551 ilv-452 leu-3121 trpC2 xyl-404 galE856 hsdL6 hsdSA29 hsdSB121 rpsL120 H1-b H2-e, p, x fla-66 pml(-) Fe122(-)*).

Клеточную суспензию готовили согласно [7] за исключением замены в первичной отмывке дистиллированной воды на 1 мМ трис-HCl, pH 8,0. 20 мкл суспензии клеток смешивали с 2 мкл раствора ДНК плазмид в буфере TE концентрации 0,1—0,2 мкг/мкл, подвергали однократному разряду на электродах и разбавляли в 230 мкл среды SOC [8]. После 30 мин инкубации при 37 °С аликвоту клеточной суспензии высевали на LB-агар с антибиотиками, обеспечивающими селекцию клеток, содержащих плазмиды. Данный метод введения ДНК в клетки *S. typhimurium* оказался высокоэффективным для всех исполь-

зованных плазмид (рисунок) и обеспечил частоту трансформации 10^7 — 10^8 колоний/мкг ДНК. Плазмидную ДНК из трансформантов выделяли методом щелочного лизиса [6]. Копийность плазмид сравнивали по результатам электрофореза в 0,7 %-ном агарозном геле.

В клетки *S. typhimurium* вводили плазмиды с геном *rplI*, кодирующим регуляторноспособные (*pEP20*, *pEP20-1*, *pMW12*, *pMW12-1*) и мутантные, с потерей этой функции (*pEP22*, *pEP12-1*, *pEP14*), белки *L10*. Плазмида *pEP20* является продуцентом нативного *L10 E. coli*, ген которого транскрибируется с собственного промотора P_{L10} , плазмида *pMW12* — аналогичным *pEP20* по конструкции продуцентом на-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Сравнение копииности ДНК плазмид, трансформированных в *S. typhimurium* LB5010 (а: 1—3 — *pEP20*; 4—6 — *pMW12*; 7—9 — *pEP12-1*; 10—12 — *pEP20-1*; 13—15 — *pMW12-1*; 16—18 — *pEP22*; 19—21 — *pEP14*) и в *E. coli* IM101 (б: 1—5 — *pEP14*; 6—10 — *pEP20-1*)

тивного *L10 S. typhimurium*. *pEP20-1* и *pMW12-1* — продуценты нативных *L10 E. coli* и *S. typhimurium* соответственно, гены которых контролируются тандемно расположенными промоторами P_{lac} и P_{L10} . Плазмида *pEP22* является продуцентом регуляторноспособного белка *L10 E. coli* с мутацией $Lys_{143}Glu_{144} \rightarrow Gln$. *pEP12-1* конструкцией подобна *pEP20* и *pMW12*, но имеет делецию в гене *rplI* и кодирует нефункциональный *L10*. *pEP14* имеет конструкцию, подобную *pEP20-1* и *pMW12-1*, кодирует нефункциональный (вследствие делеции в гене) *L10* и используется, как и *pEP12-1*, в качестве контроля. Более подробно описание и схема конструкций перечисленных плазмид в [9].

Как следует из рисунка, поддержание в данных клетках *S. typhimurium* плазмид, обеспечивающих синтез регуляторноспособных белков *L10* как *E. coli*, так и *S. typhimurium*, вызвало негативный эффект, аналогичный сверхпродукции этих белков в клетках *E. coli*. В то же время копииность плазмид *pEP12-1*, *pEP14*, *pEP22*, кодирующих неспособные к регуляции белки *L10*, оставалась высокой.

Негативный эффект поддержания в клетках энтеробактерий плазмид, продуцирующих регуляторные рибосомные белки, является простым тестом для выявления гетерологичной регуляции. Возможность применения данного подхода для обнаружения гетерологичной регуляции рибосомным белком *L10* других энтеробактерий исследуется.

Резюме. Після введення в клітини *S. typhimurium* за допомогою удосконаленої методики електропорації плазмід, що забезпечують експресію рибосомних білків *L10 E. coli*, спостерігали ефекти сповільнення росту клітин та зниження копійності плазмід. Аналогічні явища виявлені у клітин *E. coli*, що свідчить про можливість регуляції генів *rplI* *S. typhimurium* вказаними білками.

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.