



УДК 577.21

О. М. Живолуп, І. В. Кириченко, Є. Б. Патон

## РИБОСОМНИЙ БІЛОК L10 ESCHERICHIA COLI ЗДАТНИЙ РЕГУЛЮВАТИ ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ rplJL SALMONELLA TYPHI MURIUM

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

Кластер генів рибосомних білків L11, L1, L10 та L7/L12 є висококонсервативним за структурою і регуляторною організацією в ентеробактеріях [1], що робить можливою гетерологічну регуляцію експресії кодуючих їх генів. Зокрема, висока консервативність структури [2] обумовлює здатність білка L10 *S. typhimurium* керувати експресією генів rplJL-оперону *E. coli* [3].

Суперпродукція усіх відомих регуляторних рибосомних білків, у тому числі й L10, здійснює негативний для нормальних клітин-хазяїв ефект, який виявляється у пригніченні або уповільненні їх росту та зниженні копійності в них L10-експресуючих рекомбінантних плазмід [4]. Схожий ефект спостерігався при підтримуванні у клітинах *E. coli* плазмід, які забезпечують синтез L10 *S. typhimurium* [3]. Нас цікавив вплив суперпродукції регуляторного білка L10 *E. coli* на клітини *S. typhimurium*. Ввести до клітин *S. typhimurium* L10-продукуючі плазмідні стандартними методами [5, 6] нам не вдавалося, тому розробка ефективного методу введення плазмідної ДНК до цього організму (і, можливо, до інших ентеробактерій) викликає самостійний інтерес.

Успішною для трансформації клітин *S. typhimurium* виявилася методика електропорації. Її здійснювали на плоскопаралельних алюмінієвих електродах за рахунок розряду конденсаторної батареї ємністю 5 мкФ, напруженістю електричного поля 21 кВ/см. Як клітинні хазяї використовували люб'язно наданий д-ром К. Сандерсоном з *Salmonella* Genetic Stock Centre (Канада) стрептоміцинстійкий штам *S. typhimurium* LT2 LB5010 (metA22 metE551 ilv-452 leu-3121 trpC2 xyl-404 galE856 hsdL6 hsdSA29 hsdSB121 rpsL120 H1-b H2-e, n, x fla-66 nml (—) Fel22 (—)).

Клітинну суспензію готували згідно [7] за виключенням заміни у первинному відмиванні дистильованої води на 1 мМ трис-НСІ, рН 8,0. 20 мкл суспензії клітин змішували з 2 мкл розчину ДНК плазмід у буфері ТЕ концентрації 0,1—0,2 мкг/мкл, піддавали одноразовому розряду на електродах і розводили у 230 мкл середовища SOC [8]. Після 30 хв інкубації при 37 °С аліквоту клітинної суспензії висівали на LB-агар з антибіотиками, які забезпечують селекцію клітин, що містять плазмід. Даний метод введення ДНК до клітин *S. typhimurium* виявився високоефективним для усіх використаних плазмід (ма-

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

люнок) та забезпечив частоту трансформації  $10^7$ — $10^8$  колоній/мкг ДНК. Плазмідну ДНК з трансформантів виділяли методом лужного лізису [6]. Копійність плазмід порівнювали за результатами електрофорезу у 0,7 %-му агарозному гелі.

До клітин *S. typhimurium* вводили плазмиди з геном *rplJ*, який кодує регуляторноздатні (*pEP20*, *pEP20-1*, *pMW12*, *pMW12-1*) та мутантні, з втратою цієї функції (*pEP22*, *pEP-12-1*, *pEP14*), білки *L10*. Плазмиди *pEP20* є продуцентом нативного *L10 E. coli*, ген якого транскрибується з власного промотору  $P_{L10}$ , плазмиди *pMW12* — аналогічним *pEP20* за конструкцією продуцентом нативного *L10 S. typhimurium*. *pEP20-1* і *pMW12-1* — продуценти нативних *L10 E. coli* та *S. typhimurium* відповідно, гени яких контролюються тандемно розташованими



Порівняння копійності ДНК плазмід, трансформованих у *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*) та у *E. coli* JM101 (б: 1—5 — *pEP14*; 6—10 — *pEP20-1*)

промоторами  $P_{lac}$  і  $P_{L10}$ . Плазмиди *pEP22* є продуцентом регуляторно-нездатного білка *L10 E. coli* з мутацією Lys143 Glu144→Gln *pEP12-1* за конструкцією подібна до *pEP20* та *pMW12*, але має делецію у гені *rplJ* і кодує нефункціональний *L10*. *pEP14* має конструкцію, подібну до *pEP20-1* та *pMW12-1*, кодує нефункціональний (внаслідок делеції в гені) *L10* і використана, подібно *pEP12-1*, як контроль. Більш ретельний опис та схема конструкцій наведених плазмід у [9].

Як випливає з малюнка, підтримування у даних клітинах *S. typhimurium* плазмід, що забезпечують синтез регуляторноздатних білків *L10* як *E. coli*, так і *S. typhimurium*, викликало негативний ефект, аналогічний надпродукції цих білків у клітинах *E. coli*. У той же час копійність плазмід *pEP12-1*, *pEP14*, *pEP22*, які кодують нездатні до регуляції білки *L10*, залишалася високою.

Негативний ефект підтримування у клітинах ентеробактерій плазмід, що продукують регуляторні рибосомні білки, є простим тестом для виявлення гетерологічної регуляції. Можливість застосування цього підходу до виявлення гетерологічної регуляції рибосомним білком *L10* інших ентеробактерій досліджується.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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.— 6, № 5.— С. 5—23.

Ин-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 плазмідом 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. typhimurium* 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. Засадом 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-