



УДК 577.21

А. Н. Живолуп, Е. Б. Патон

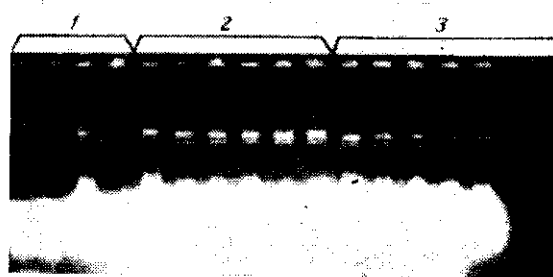
РЕГУЛЯТОРНАЯ СПОСОБНОСТЬ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L10 ESCHERICHIA COLI ВЫЯВЛЕНА В ОТНОШЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОПЕРОНА rplJL CITROBACTER FREUNDII

Выявлена способность рибосомного белка L10 *E. coli* регулировать экспрессию генов rplJL-оперона *C. freundii*. Произведена оценка эффективности регуляции этим белком экспрессии генов rplJL *C. freundii*.

Кластер генов rplKAIL энтеробактерий исключительно консервативен по своей структурной и функциональной организации. Для обоих оперонов этого кластера (rplKA и rplJL) ряда энтеробактерий обнаружена возможность гетерологической регуляции, т. е. взаимозамещаемость регуляторных белков, относящихся к указанному кластеру [1, 2]. Так, для *E. coli* показана вероятность контроля экспрессии генов оперона rplKA белками *Serratia* и *Proteus*, для оперона rplJL — белком *Salmonella typhimurium*. В свою очередь, белок L10 *E. coli* способен регулировать оперон rplJL *S. typhimurium* и *Klebsiella pneumoniae* [3, 4]. Подобная гетерологическая регуляция обеспечивается высокой консервативностью структурной организации регуляторных белков L11 и L10 [1, 2]. Регуляторная способность белка L10 выявляется по двум характерным эффектам: 1) замедление роста и снижение жизнеспособности клеток-реципиентов, обусловленные дефицитом белка L7/L12, возникающим вследствие отрицательной регуляции экспрессии хромосомного гена rplL избытком чужеродного белка; 2) снижение копийности рекомбинантных плазмид, кодирующих белок L10 и обеспечивающих его избыточный синтез. Аналогичные эффекты в клетках-реципиентах проявляются и в случае экспрессии белка гетерологического происхождения, сохраняющего в них регуляторную способность.

В настоящем сообщении приводятся результаты исследования возможности гетерологической регуляции генов оперона rplJL *C. freundii*, т. е. контроля экспрессии генов rplJL *C. freundii* белком L10 *E. coli*. На первом этапе работы для установления принципиальной возможности такой регуляции в клетках-реципиентах обеспечивали избыточный синтез белка L10 *E. coli*. Для этого в них вводили плазмиды, обеспечивающие синтез этого белка, методом электропорации, описанным в [3, 4]. Эффективность трансформации составила $5 \cdot 10^6$ колоний на 1 мкг плазмидной ДНК. Использовали штамм энтеробактерии *C. freundii* 771, любезно предоставленный д-ром Ван-Дойном (Лейденский ун-т). Копийность плазмид в трансформированных клетках оценивали, выделяя ДНК из жидкой ночной культуры *C. freundii* щелочным методом и затем сравнивая результаты электрофоретического разделения проб. В качестве плазмиды, обеспечивающей избыточную продукцию нативного L10 *E. coli* в *C. freundii* была выбрана pEP20 [5]; как контрольные —

pEP22 [5] и *pEP12-1* [5], которые кодируют мутантные рекомбинантные *L10 E. coli*, утратившие способность к регуляции. Анализ поддержания плазмид клетками *C. freundii* свидетельствовал о сохранении белком *L10 E. coli* способности регулировать экспрессию генов *rplJL*-оперона клеток-реципиентов. Это подтверждает (см. рисунок) снижение копийности плазмиды *pEP20*, кодирующей нативный *L10 E. coli* по сравнению с *pEP22* и *pEP12-1*, обеспечивающими синтез регуляторно-неспособных белков *L10*. Интересно отметить, что снижение копийности плазмиды *pEP20* в данном организме менее выражено, чем в клетках *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* или *E. coli* [2, 3]. Для исследования молекулярных механизмов регуляции экспрессии *rplJL*-оперона *C. freundii* необходимо было выделить участок генома этого организма, кодирующий лидерную область анализируемого оперона. С помощью ферментативной амплификации (полимераз-



Картина электрофоретического разделения плазмидной ДНК (1 — *pEP20*; 2 — *pEP22*; 3 — *pEP12-1*), выделенной из аликвот жидкой культуры *C. freundii*

ная цепная реакция) из генома этой энтеробактерии получен фрагмент, кодирующий лидерную область бицистронной мРНК *L10-L12*. В качестве праймеров использованы олигонуклеотиды, гомологичные последовательностям 885—912 и 1787—1805 *E. coli* (нумерация согласно [6]). Выделенный фрагмент клонировали и установили первичную структуру его ДНК из трех отдельных клонов. Определение амплифицированной последовательности подтвердило, что она представляет собой лидерную и 5'-концевую части структурной области гена *rplJ* и обладает чрезвычайно высокой гомологией с аналогичным участком генома *E. coli* (сообщение готовится к публикации).

Дальнейшее исследование было посвящено количественной оценке эффективности регуляции белком *L10 E. coli* генов *rplJL C. freundii*, для чего использовали метод, описанный нами ранее [7]. Охарактеризованный фрагмент послужил основой для конструирования репортерной плазмиды, с помощью которой в разработанной нами системе регистрации *in vivo* регуляторной способности белков и степени регулируемости ими оперона *rplJL* мы исследовали пару *L10 E. coli* — лидер мРНК *L10-L12*, содержащий сайт-мишень *C. freundii*. Уровень экспрессии репортерного гена под действием продукции нативного белка *L10 E. coli* снизился в 1,7 раза по сравнению с контролем, что подтвердило принципиальную возможность этого белка контролировать экспрессию генов *rplJL C. freundii*. В то же время регуляторная способность *L10 E. coli* для этой энтеробактерии значительно ниже, чем для *S. typhimurium* или *E. coli* (8,3 и 5,6 соответственно). Последнее согласуется с наблюдаемым менее выраженным снижением копийности плазмид — продуцентов нативного *L10 E. coli* в клетках *C. freundii* относительно *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* или *E. coli*. Более слабая регулируемость экспрессии генов оперона *rplJL C. freundii* гетерологичным *L10* наиболее вероятно связана с особенностями структурной организации лидерной области мРНК этих генов. Эта проблема в настоящее время продолжает исследоваться.

Резюме. Виявлено здатність рибосомного білка *L10 E. coli* регулювати експресію генів *rplJL*-оперона *C. freundii*. Зроблено оцінку ефективності регуляції цим білком експресії генів *rplJL C. freundii*.

Summary. The *E. coli* ribosomal protein *L10* was found capable to regulate *rplJL* genes expression in *Citrobacter freundii*. Efficiency with which this protein can regulate expression of *rplJL* genes of *C. freundii* was estimated quantitatively.

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* operon by heterologous *L1* proteins // *Mol. and Gen. Genet.*—1987.—210, N 1.—P. 52—59.
2. Paton E. B., Woodmaska M. I., Kroupskaya I. V. et al. Evidence for the ability of *L10* ribosomal proteins of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* to regulate *rplJL* genes expression in *E. coli* // *FEBS Let.*—1990.—265, N 1, 2.—P. 129—132.
3. Живолуп А. Н., Кириченко И. В., Патон Е. Б. Рибосомный белок *L10 Escherichia coli* способен регулировать экспрессию генов *rplJL Salmonella typhimurium* // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 3.—С. 37—39.
4. Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Возможность гетерологичной регуляции экспрессии генов оперона *rplJLKlebsiella pneumoniae* белком *L10 Escherichia coli* // Там же.—С. 51—53.
5. 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.
6. Post L. F., Strycharz G. D., Nomura M., Lewis H. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA-polymerase subunit in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76, N 4.—P. 1697—1701.
7. Живолуп А. Н., Крупская И. В., Вудмаска М. И., Патон Е. Б. Сравнение *in vivo* регуляторной способности рибосомных белков с различной первичной структурой // *Биополимеры и клетка.*—1992.—8, № 3.—С. 39—42.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии
АН Украины, Киев

Получено 16.06.93

УДК 575.24

Ю. Н. Александров

РЕКОМБИНАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ АЛЛЕЛЬНЫХ ОТНОШЕНИЙ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ У ДРОЗОФИЛЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ

Мутагены типа ДНК или синтетических полинуклеотидов, испытанные на второй хромосоме дрозофилы, обнаружили одну важную специфическую особенность. В комплементарном тесте между летальными мутациями, индуцированными этими мутагенами, выявились сложные типы их взаимодействий. Многие хромосомы с летальными благодаря аллельным «зацеплениям» были связаны друг с другом через другие хромосомы, хотя прямых аллельных взаимодействий между парами изучаемых хромосом, как правило, не наблюдалось. Окончательное доказательство мультимутационного эффекта действия испытанных мутагенов получено рекомбинационным анализом мутаций.

Изучать мутации, индуцированные различными физическими и химическими мутагенами, можно в тесте на аллелизм, причем взаимоотношения комплементирующих и некомплементирующих мутантов изображаются в виде матриц, на основе которых строят карты комплементации [1]. Мутации на таких картах имеют вид перекрывающихся отрезков, если мутации некомплементарны (аллельны), или вид неперекрывающихся отрезков, если мутации комплементарны (неаллельны). Линии на карте соответствуют отдельным мутациям либо нескольким мутациям и называются группами комплементации. Их концы, спроецированные на одну прямую, образуют единицы комплементации или клоны.

Подобные общепринятые приемы использованы при построении матриц аллелизма рецессивных летальных мутаций, индуцированных у

© Ю. Н. Александров, 1993