



УДК 577.21

© И. В. Крупская, Е. Б. Патон, 1990

ВЛИЯНИЕ РЕДКИХ КОДОНОВ В 5'-КОНЦЕВОЙ ОБЛАСТИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *rplJ'*-*lacZ* и *rplL'*-*lacZ*

Путем слияния с геном *lacZ* 5'-концевых фрагментов генов *rplJ* и *rplL* *E. coli* показано снижение экспрессии гибридных генов в результате появления вблизи инициаторного кодона редких кодонов GGG и CCC.

В результате исследования, проведенного ранее [1], мы предположили, что регуляция экспрессии генов *rplL*-оперона *E. coli*, кодирующих неэквивалентно синтезирующиеся рибосомные белки L10 и L7/L12, может осуществляться на уровне трансляции. В этой связи интерес представляла характеристика сайтов инициации трансляции (СИТ) указанных генов. В последнее время знания о специфических особенностях СИТ генов значительно пополнились экспериментальными данными. Очевидным стало, что при образовании инициаторного комплекса необходимым является контекст участка мРНК от 20 нуклеотидов выше и до 13 ниже инициаторного кодона [2] как с точки зрения первичной, так и вторичной структуры. Последовательность Шайна — Далгарно, расстояние от нее до инициаторного кодона, инициаторный и второй кодона как своей первичной, так и вторичной структурой определяют эффективность инициации трансляции для данной мРНК. Несмотря на ряд закономерностей, известно много примеров, когда очевидные причины большей или меньшей эффективности определенных СИТ выявить не удается. Одним из способов оценки и сравнения их эффективности является клонирование содержащих СИТ фрагментов ДНК в специальные векторные плазмиды. Ранее мы убедились [1], что в качестве такой плазмиды может быть использована *pNM481* [3]. Несмотря на многокopiesность, низкий уровень экспрессии гибридных генов *lacZ*, транскрибируемых со слабого промотора P_4 в этой плазмиде, делал применение *pNM481* аналогичным низкокоopiesным плаزمидам или конструированию гибридных генов *lacZ* в хромосоме. В плазмиде *pNM481* [3] клонировали фрагменты ДНК, содержащие участки инициации трансляции генов *rplJ* и *rplL*, следующим образом. Укороченный до двух 5'-концевых кодонов фрагмент гена *rplJ* выделяли из ранее описанной плазмиды *pEP15* [4] с промотором P_{L10} (в виде *Eco47III*₁₂₉₁-*DraI*₁₇₂₆-фрагмента) и без него (в виде *BspRI*₁₅₂₂-*DraI*₁₇₂₆-фрагмента) и встраивали в *BamHI*- (восполнив концы обработкой фрагментом Кленова ДНК полимеразы I *Escherichia coli*) и *SmaI*-сайты *pNM481* (рис. 1, а), достигая таким образом необходимой рамки считывания. Экспрессию слитых генов оценивали по активности кодируемых ими гибридных β-галактозидаз, которую измеряли по стандартному методу [5]. Оказалось, что в случае встраивания в *SmaI*-сайт (плазмиды *pEE-S*) экспрессия генов *rplJ'*-*lacZ* в 10 раз ниже, чем при встраивании в сайт *BamHI* (плазмиды *pEE-B*). Активность гибридных β-галактозидаз для *pEE12-S*, *pEE14-B* и *pEE14-S* составила 11,6; 2 и <0,05% соответственно по сравнению с *pEE12-B*. Транскрипция гибридных генов *rplJ'*-*lacZ* обеспечивалась разными промоторами — сильным P_{L10} и слабым P_4 -промотором плазмиды *pNM481* (см. рис. 1, а). Поэтому можно полагать, что меньший уровень экспрессии не связан с более низкой стабильностью гибридной мРНК в случае *pEE14-S* и *pEE14-B*. Известно [6], что стабильность гибридных β-галактозидаз намного ниже, чем у нативной. Учитывая это обстоятельство, мы сравнили стабильность β-галактозидаз, кодируемых *pEE12-B*, *pEE12-S*, *pEE14-B* и *pEE14-S*, по методу [6]. Действительно, и в нашем случае стабильность всех гибридных β-галактозидаз при 37—42 °С была гораздо ниже, чем у нативной, кодируемой хромосомным геном *lacZ* в штамме *E. coli* K802 [7]. Интересно, однако, что ста-

бильность гибридных β-галактозидаз, образуемых при встраивании в *SmaI*-сайт, оказалась не меньшей, а даже большей, чем у образованных путем слияния с геном *lacZ* по сайту *BamHI* *pNM481*. Таким образом, больший уровень экспрессии β-галактозидазы, кодируемой *pEE12-B* и *pEE14-S*, не обуславливался стабильностью гибридных белков. Мы проверили также возможное влияние на уровень экспрессии гибридных β-галактозидаз штаммов-хозяев. С этой целью для поддержания плазмид и последующего измерения уровня экспрессии гибридных генов *rplJ'*-*lacZ* были использованы штаммы

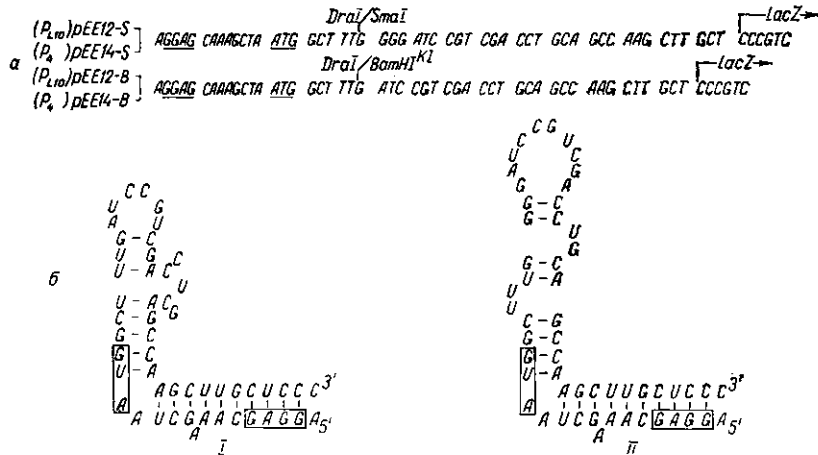


Рис. 1. Первичная структура 5'-концевых фрагментов гибридных генов *rplJ'*-*lacZ* и *rplL'*-*lacZ* (а) и модели вторичной структуры участков инициации трансляции мРНК этих генов (б), образуемых при встраивании в *BamHI*-(I) и *SmaI*-(II) сайты *pNM481* Fig. 1. Primary structure of 5'-terminal fragments of hybrid *rplJ'*-*lacZ* and *rplL'*-*lacZ* genes (а) and models of mRNA secondary structure of the translation initiation sites of these genes (б) created by cloning in the *BamHI* (I) and *SmaI* (II) sites of the *pNM481* plasmid

E. coli *ton-1*/SG20050 [8] со сниженной протеазной активностью, а также штаммы *MC1061* [3], *TG-1* [9], *JM101* [10], имеющие *Lac*⁺-фенотип и широко используемые для поддержания плазмид, обеспечивающих *Lac*⁺-фенотип. Влияние перечисленных штаммов-хозяев *E. coli* на уровень экспрессии гибридных генов *rplJ'*-*lacZ*, обнаружено не было. Сравнение первичной структуры генов *rplJ'*-*lacZ*, полученных при встраивании в *SmaI*- и *BamHI*- сайты (рис. 1), показало, что отличаются они наличием в генах, образованных встраиванием фрагмента *rplJ* в сайт *SmaI* кодона GGG в положении 4 после инициаторного кодона AUG. Кодон GGG не встречается в генах *rplKALL* [11] и является редким для *E. coli* [12]. Предполагая возможное изменение вторичной структуры 5'-конца гибридной мРНК в результате возникновения кодона GGG, мы сравнили модели вторичной структуры мРНК генов, образованных встраиванием в *BamHI*- и *SmaI*-сайты (рис. 1, б (I) и (II) соответственно). Как видно, появление GGG-кодона не сказалось на спаривании нуклеотидов области Шайна — Даргарно и инициаторного кодона, что могло бы оказать существенное влияние на уровень экспрессии генов. В то же время наличие кодона GGG привело к стабилизации вторичной структуры. Изменение свободной энергии (ΔG), обусловленное появлением кодона GGG (рис. 1, б: модель структуры I по сравнению с II), составило — 5,7 ккал/моль. Экспериментально установлено, что в некоторых случаях даже очень малые значения G (от —1 до —4 ккал/моль) могут приводить к 10-кратным отличиям в уровне экспрессии генов [6]. Гены рибосомных белков, относящиеся к наиболее высокоэкспрессируемым, по-видимому, обладают сильными сайтами инициации, что показано для гена *rplK* [13].

Нуклеотидная последовательность полилинкерной области плазмиды-вектора приводила к появлению в генах *rplJ'*-*lacZ* также и кодона CCC, занимающего 14-е и 13-е положения в *pEE12-S* и *pEE14-S*, а также в *pEE12-B* и *pEE14-B* соответственно. Этот кодон, как и GGG, не встречается в генах *rplKALL* и является редким для *E. coli* [11, 12]. Возможное влияние кодона CCC на эффективность экспрессии в зависимости от его удаленности от инициаторного мы попытались исследовать при помощи конструирования генов *rplL'*-*lacZ*. В этом случае с геном *lacZ* сливали 5'-концевые фрагменты *rplL*, содержащие 6 (*SnaBI-Sau3A1*, выступающие концы восполнены обработкой фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*) и 13 (*AluI-AluI*-фрагмент) кодо-

нов соответственно. Нуклеотидная последовательность фрагментов рекомбинантных генов *rplL'-lacZ* представлена на рис. 2, а. Оба фрагмента встраивали в одинаковый контекст — сайт расщепления *pNM481 HindIII* (концы достраивали с помощью фрагмента Кленова ДНК полимеразы I *E. coli*). Таким образом, кодон CCC оказывался в гене *rplL'-lacZ* 10-м в *pEE15-S* и 17-м в *pEE15-A*. Уровень активности β-галактозидазы, кодируемой *pEE15-S*, составил 6% относительно *pEE15-A*, у которой он был равным *rplK7* [1]. Полученные ранее экспериментальные данные [1] позволяют считать, что в случае *pEE15-A* промотор *P_{L12}* не влияет на уровень экспрессии гибридного гена *rplL'-lacZ*. Различный уровень экспрессии генов *rplL'-lacZ*, как и *rplI'-lacZ*, не зависел от штамма-хозяина *E. coli*, используемого для поддержания рекомбинантной плазмиды.

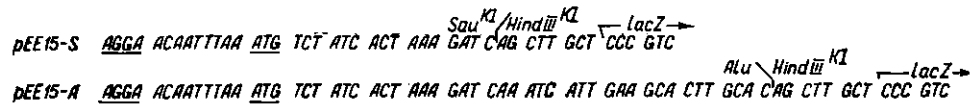


Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагментов гибридных генов *rplL'-lacZ* (а) и модель вторичной структуры участка инициации трансляции мРНК этих генов (б)

Fig. 2. Nucleotide sequence of fragments of the hybrid *rplL'-lacZ* genes (а) and model of the mRNA secondary structure for the translation initiation site of these genes (б)

β-Галактозидаза, кодируемая *pEE-S*, не была менее стабильной по сравнению с *pEE15-A*. Интересно, что сравнение вторичной структуры мРНК гибридных генов *rplL'-lacZ* (рис. 2, б) не дает оснований для предположения о ее специфическом влиянии на уровень экспрессии генов. В данном случае одинаковыми для обоих генов были не только вторичная структура мРНК в сайте инициации трансляции, но и значение ΔG, рассчитанное в соответствии с [14]. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о влиянии редких кодонов на уровень экспрессии генов *rplI'-lacZ* и *rplL'-lacZ*. В отношении определения природы эффекта кодона GGG окончательный вывод станет возможным после замены его на другие: еще более редкий кодон GGA и часто встречающийся GGC. В случае гена *rplL'-lacZ* присутствие редкого кодона CCC оказывает эффект на расстоянии 8 кодонов после инициаторного и не оказывает — при увеличении расстояния до 15 кодонов. Из литературы известны случаи, когда присутствие редких кодонов значительно сказывается на эффективности трансляции, и, таким образом, на уровне экспрессии генов. На протяжении гена *lacZ* встречаются по 9 CCC и GGG кодонов. Снижение экспрессии гибридных генов *lacZ* при появлении этих редких кодонов в 5'-областях гибридных генов, следовательно, отражается на эффективности не элонгации, а инициации трансляции их мРНК.

Авторы выражают искреннюю признательность А. В. Ельской и М. В. Родниной за участие в обсуждении результатов работы.

INFLUENCE OF RARE CODONS IN THE 5'-TERMINAL REGIONS ON THE EXPRESSION OF GENES RPLI'-LACZ AND RPLL'-LACZ

I. V. Kroupskaya, E. B. Paton

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

Summary

Fusion of 5'-terminal fragments of *E. coli rplI* and *rplL* genes to *LacZ*, has permitted showing that expression of hybrid *rplI'-lacZ* and *rplL'-lacZ* decreases as a result of appearance of rare GGG and CCC codons in the vicinity of the initiator AUG codon.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крупская И. В., Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Конструирование гибридных генов *lacZ* для изучения механизмов регуляции экспрессии генов *rplJL*-оперона *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 91—100.
2. Gold L. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli* // Ann. Rev. Biochem.— 1988.— 57, N 1.— P. 199—233.
3. Minton N. P. Improved plasmid vectors for isolation of transcriptional *lac* gene fusions // Gene.— 1984.— 31, N2.— P. 269—273.
4. 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.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 395 с.
6. Effects of heterologous ribosomal binding sites on the transcription and translation of the *lacZ* gene *Escherichia coli* / A. C. Looman, M. de Gruyter, A. Vogelaar, P. H. van Knippenberg // Gene.— 1985.— 37, N 1.— P. 145—154.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 424 с.
8. Trisler P., Gottesman S. *lon* Transcriptional regulation of genes necessary for capsul polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12 // J. Bacteriol.— 1984.— 160, N 1.— P. 184—191.
9. Carter P. Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using r113 vectors // Nucl. Acids Res.— 1985.— 13, N 12.— P. 4431—4443.
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. 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.
12. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data / T. Maruyama, T. Goyobori, S. Aota, T. Ikemura // Nucl. Acids Res.— 1985.— 14, N 1.— P. 151—190.
13. Secondary structure as primary determinant of the efficiency of ribosomal binding sites in *Escherichia coli* / A. C. Looman, J. Bodlaender, M. Gruyter et al. // Ibid.— 1986.— 15, N 13.— P. 5481—5497.
14. Zuker M., Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information // Nucl. Acids Res.— 1981.— 9, N 1.— P. 133—148.

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

Получено 28.11.89

УДК 535.375

© Д. Н. Говорун, И. В. Кондратюк, Я. Р. Мищук,
Н. В. Желтовский, 1990

ИСКЛЮЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МОЩНОСТИ ЛАЗЕРА НА ТОЧНОСТЬ РЕГИСТРАЦИИ СПЕКТРОВ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА БИОПОЛИМЕРОВ

Описан разработанный авторами двухканальный счетчик фотонов, предназначенный для эксплуатации в составе прецизионного КР-спектрометра, работающего в цифровом режиме, позволяющий практически полностью исключить влияние нестабильности мощности лазера на точность регистрации спектров. Анализируются некоторые аспекты его эффективного использования.

Одним из основных факторов, ограничивающих точность регистрации спектров комбинационного рассеяния (КР) света биополимеров, является нестабильность излучения лазера, используемого для их возбуждения [1].

Эффективным средством повышения точности регистрации спектров КР является построение структурно-функциональной схемы КР-спектрометра по принципу двухканального автоматического регулирования, когда сигнал КР в основном фотометрическом канале, ошумленный нестабильностью интенсивности лазерного излучения, регулируется сигналом опорного фотометрического канала, линейно отслеживающего нестабильность возбуждающего излучения, таким образом, что на выходе спектрометра реализуется частное от деления сигнала основного на сигнал опорного канала, пропорциональное сечению КР на данной частоте [2].