



УДК 577.21:577 (217.35+217.52)

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСЛЯЦИИ ДИСТАЛЬНОГО ГЕНА
В ПОЛИЦИСТРОНАХ ЗАВИСИТ ОТ ВЗАИМНОГО РАСПОЛОЖЕНИЯ
РЕГУЛЯТОРНЫХ СИГНАЛОВ НА МАТРИЦЕ**

*Кравченко В. В., Жамин В. В., Гилева И. И.,
Дихошвай В. А., Добрынин В. И.*, Филиппов С. А.*,
Коробко В. Г.**

*Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт
биологически активных веществ, Бердск;*

**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Фрагмент *Taq*-381 ДНК бактериофага M13, несущий промотор p_{HII} , ген IX, часть гена VIII, и полусинтетический ген β -галактозидазы *E. coli* (*lacZ*) были использованы для создания искусственного полицистрона IX-VIII-*lacZ*. Относительное расположение терминирующего кодона в гене VIII и участка инициации трансляции гена *lacZ* изменяли путем введения в межцистронную область делеций и вставок, которые не затрагивали сигналов инициации трансляции дистального гена *lacZ*. Клонирование созданных полицистронов в векторе pBR322 дало серию плазмид, различающихся положением терминирующего кодона цистрона VIII относительно сайта SD и иницирующего триплета гена *lacZ*. Показано, что эффективность трансляции *lacZ* в составе исследуемых полицистронных мРНК зависит от взаимного расположения терминирующего триплета цистронов VIII и иницирующего кодона гена *lacZ*. Установлено, что перекрывание терминирующего и иницирующего кодонов генов VIII и *lacZ* (ATGA) обеспечивает одинаковые уровни трансляции обоих генов. Расположение терминаторного кодона гена VIII внутри последовательности SD цистрона *lacZ* или на расстоянии 10 нуклеотидов до нее приводит к 20–30-кратному увеличению уровня синтеза β -галактозидазы по сравнению с предыдущим вариантом организации полицистрона. Обнаружены также различия в уровнях синтеза β -галактозидазы при удалении стоп-кодона в цистроне VIII на расстояние 50 нуклеотидов от сайта SD гена *lacZ* или перемещении его в кодирующую часть гена *lacZ*. Полученные данные указывают на существование структурно-функциональной связи между уровнем экспрессии гена и его расположением относительно других генов в полицистронной матрице.

Основная часть генов у прокариот экспрессируется в составе полицистронных мРНК, обеспечивающих трансляцию нескольких белков [1]. При этом уровни синтеза отдельных белков, считываемых с такой мРНК, отличаются друг относительно друга от нескольких раз до нескольких сотен раз [2–5], что предполагает существование механизмов регуляции трансляции полицистронных мРНК. Во всех известных случаях точкой приложения регуляции на уровне трансляции у прокариот является стадия инициации, которая может осуществляться несколькими путями.

Во-первых, количественно разный уровень продукции на разных цистронах одной полицистронной мРНК может осуществляться за счет разной «силы» инициаторных районов матрицы. В частности, степень комплементарности 16S рРНК, длина последовательности SD [6] и расстояние от нее до иницирующего кодона могут определять этот параметр для каждого цистрона [7]. Во-вторых, избирательная инициация трансляции некоторых генов может регулироваться белками [8]. Молекулярный механизм этой регуляции, по-видимому, напоминает процессы регуляции транскрипции с помощью репрессора (см., например, [9]) и сводится к взаимодействию белка-регулятора с тем или иным инициаторным районом мРНК, блокирующим ассоциацию с рибосомой [8, 10–12]. В-третьих, известен способ негативной регуляции инициации за счет пространственной структуры иницирующего района мРНК: образование стабильной вторичной и третичной структуры может блокировать инициацию [13–15].

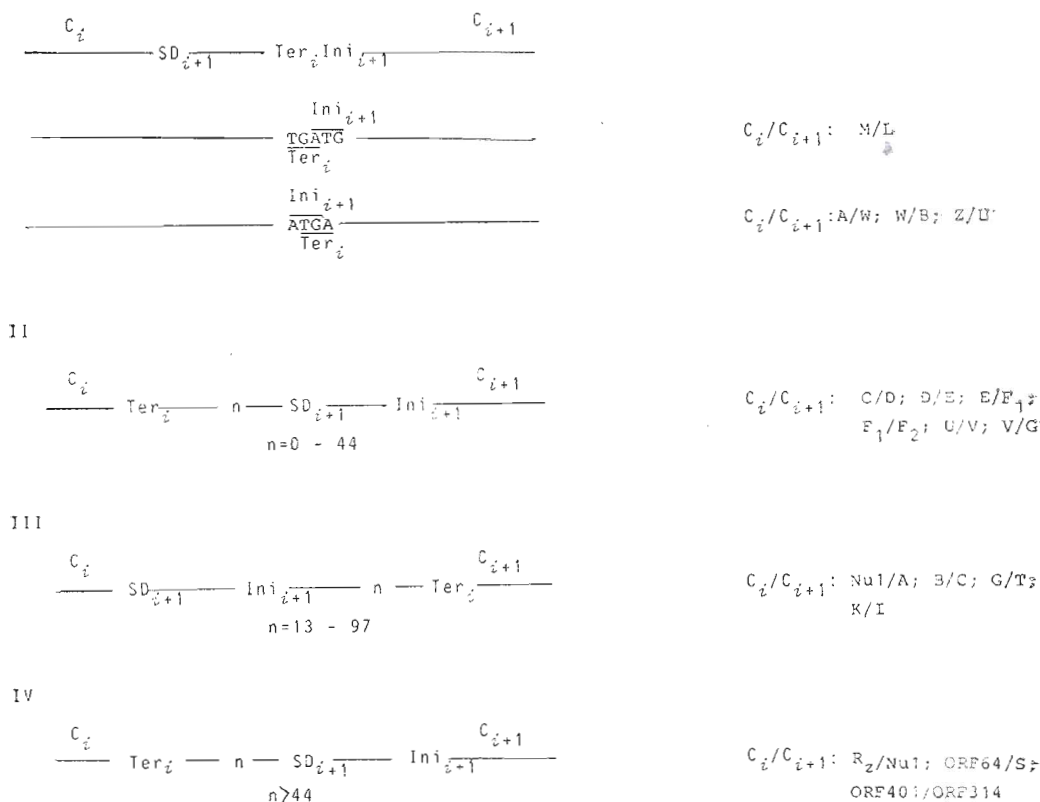


Рис. 1. Классификация полицистронов в зависимости от взаимного расположения регуляторных сигналов, разделяющих два соседних гена — C_i и C_{i+1} . Ter_i — терминатор трансляции цистрона C_i ; Ini_{i+1} — участок инициации трансляции цистрона C_{i+1} ; SD_{i+1} — сайт связывания рибосомы гена C_{i+1} ; n — расстояние в нуклеотидных остатках между последним и первым нуклеотидами соответствующих регуляторных сигналов. Справа приведены конкретные примеры сопряжения C_i/C_{i+1} -цистронов, встречающихся в поздней мРНК бактериофага λ [26]

В таком случае лишь разрушение пространственной структуры соответствующего района мРНК открывает путь для инициации. Это может происходить при разрезании определенных участков матрицы РНКазой III [16—18], и тогда регуляция инициации трансляции отдельных цистронов, по-видимому, осуществляется по первому пути (см. выше), за исключением тех случаев, когда действие РНКазы III приводит к инактивации кодирующей части матрицы [18—20]. Другая возможность дестабилизации пространственной структуры полицистронной мРНК — расплетающее действие рибосом, читающих предшествующий цистрон [21—25]. Поскольку рибосомы в процессе трансляции изменяют макроструктуру матрицы в направлении $5' \rightarrow 3'$, можно предполагать, что порядок записи генов и их взаимное расположение в полицистронной мРНК имеют совершенно определенное биологическое значение и являются одним из факторов, определяющих количественные соотношения синтезируемых белков. В связи с этим особый интерес представляют исследования структурно-функциональной организации межцистроновых областей мРНК с целью изучения молекулярных механизмов трансляции полицистрона.

Рассматривая структурную организацию межгенных участков в мРНК поздних генов бактериофага λ [26], в РНК-содержащих фагах [27, 28], а также в полицистронных оперонах *E. coli* [5, 22, 23, 29], мы условно разделили их на четыре типа (рис. 1). Изучение влияния межцистроновых областей на уровень экспрессии генов в природных полицистронных мРНК связано с определенными трудностями (необходимость разработки методов тестирования продуктов трансляции и их идентификации, структурные ограничения) и требует создания модельной системы.

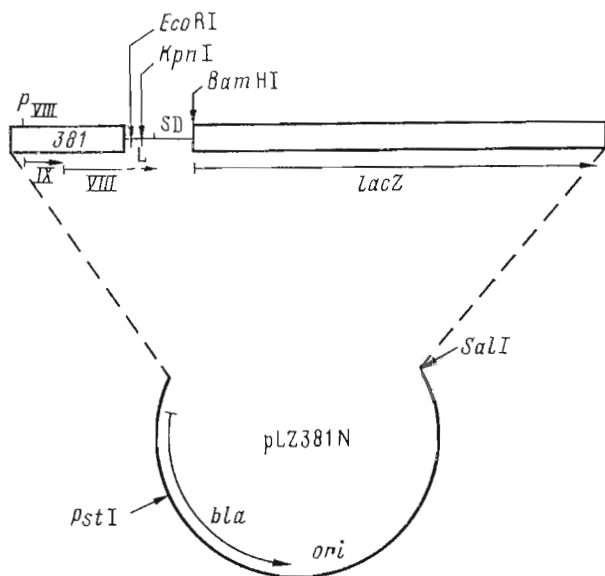


Рис. 2. Общая схема структуры рLZ-плазмид (рLZ381N). В качестве векторов использованы ДНК рLZ2, рLZ4 [32] и рLZ381 [30]; р_{VIII}, IX, VIII — промотор и гены бактериофага М13, входящие в состав фрагмента ТаqI-381 [30, 31]; L — синтетический линкер, с помощью которого изменяли рамку трансляции гена VIII; SD — синтетический сайт связывания рибосомы гена *lacZ*. Показаны некоторые уникальные сайты расщепления рестриктазами

В предварительном сообщении нами была описана модельная система, представляющая собой искусственный полицистрон на основе фрагмента ТаqI-381 (цифра здесь и далее обозначает длину фрагмента в парах оснований) ДНК бактериофага М13, содержащего промотор р_{VIII}, ген IX и часть гена VIII, и полусинтетического гена β-галактозидазы *E. coli* (*lacZ*) [30, 31]. В настоящей работе на основе ДНК рLZ381 [30], несущей искусственный полицистрон, обозначаемый далее IX-VIII-*lacZ*, получена серия рLZ-плазмид (рис. 2), различающихся первичной и вторичной структурой межцистронных областей на стыке генов VIII* и *lacZ*, и изучено влияние этих факторов на уровень синтеза β-галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих сконструированные плазмиды.

С использованием сайтов *EcoRI*, *KpnI* и *BamHI* были осуществлены делеции вставки в межцистронной области VIII-*lacZ*. Структуру полученных таким способом плазмидных ДНК подтверждали расщеплением рестриктазами *BspI*, *EcoRI*, *BamHI*, *KpnI*, *PstI* и *PvuII* по отдельности и в комбинации и прямым секвенированием нуклеотидной последовательности в районе вставок и делеций. Полученные плазмиды относятся к I—IV типам (ср. рис. 1 и 3).

Для того чтобы определить уровень трансляции гена VIII, была получена также плаزمида рLZ381/F в которой трансляция цистрона VIII без прерывания переходит в трансляцию гена *lacZ* с образованием «химерного» белка (рис. 3), представляющего собой β-галактозидазу с дополнительными 56 аминокислотными остатками на N-конце, соответствующими продукту гена VIII. С учетом того, что даже значительные добавки (более 300 аминокислот) к N-концу β-галактозидазы практически не изменяют ее удельную активность [33], измерение ферментативной активности β-галактозидазы в варианте рLZ381/F позволяет оценить уровень экспрессии цистрона VIII для всех полученных полицистронов IX-

* Во фрагменте ТаqI-381 содержится неполный ген VIII [31], но для простоты изложения мы в работе использовали термины «ген VIII» и «цистрон VIII» для обозначения всех вариантов искусственных структур, 5'-концевая часть которых содержит последовательность этого гена. То же относится к продукту гена VIII — белку В.

VIII- <i>lacZ</i>		A_2
pLZ381/F	-VIII-GGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAATTCAGTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGGTAC- <i>lacZ</i> -	1.0
I		
pLZ381/SD ⁻	-VIII-----GAAATTCATGTTGTGATCCATGACCATGATTACCA- <i>lacZ</i> -	1.0
pLZ381/Kpn1 ⁻	-VIII-AAGCTGTTAAGAAATTCACCTCGAATTCAGTAAAGGAGTGGATCCATGACCATGATT----- <i>lacZ</i> -	1.0
pLZ381/23A	-VIII-TCGGTACCCCCACACACCCACACCAAGTACCATAAGGAGTGGATCCATGACCATGATT----- <i>lacZ</i> -	1.8
pLZ381/23B	-VIII-----TTGGTCTGGGTGTGTGGGGGTAC----- <i>lacZ</i> -	1.0
II		
pLZ381/24B	-VIII-CGGTACTTGGTCTGGGTGTGTGGGGTACCAGATAAGGAGTGGATCCATGACCATGATT----- <i>lacZ</i> -	10.4
pLZ381	-VIII-TGTTTAAGAAATTCACCTCGAATTCAGTAAAGGAGTGGATCCATGACCATGATT----- <i>lacZ</i> -	22.2
pLZ381/M ⁻	-VIII-----ATGACCATTCAGCAATTC----- <i>lacZ</i> -	13.1
pLZ381/4	-VIII-TAAGAAATTCACCTCGAATTCAGTAAAGGAGTGGATCCATGACCATGATTACCA- <i>lacZ</i> -	21.4
pLZ381/4M ⁻	-VIII-----ATGACCATTCAGCAATTC----- <i>lacZ</i> -	13.3
III		
pLZ381/1T	-VIII-GTTTAAGAAATTCACCTCGAATTCAGTAAAGGAGTGGATCCATG-----41-----TGAC- <i>lacZ</i> -	2.7
pLZ381/1C	-VIII-----C----- <i>lacZ</i> -	2.4
pLZ381/19A	-VIII-GAATTCGCCCCACACACCCACACCAAGTACCATAAGGAGTGGATCCATG-----41-----TGAC- <i>lacZ</i> -	6.9
pLZ381/19B	-VIII-----GTACTTGGTGTGGGTGTGTGGGG----- <i>lacZ</i> -	1.0
IV		
pLZ381/27A	-VIII-TAATTCGGTACCCCCACACACCCACACCAAGTACCATAAGGAGTGGATCCATGACCATGATT- <i>lacZ</i> -	15.7
pLZ381/50	-VIII----- (CCCCACACACCCACACCAAGTAC) ₂ ----- <i>lacZ</i> -	15.7
pLZ381/27B	-VIII-----TTGGTCTGGGTGTGTGGGGGTAC----- <i>lacZ</i> -	2.2

Рис. 3. Нуклеотидные последовательности ДНК плазмид pLZ381N в районе стыка генов VIII и *lacZ*. VIII-*lacZ* – химерный ген, содержащийся в плазмиде pLZ381/F; I–IV – группа плазмид, в которых взаимное расположение генов VIII и *lacZ* соответствует типам I–IV на рис. 1. Последний (G) и первый (A) нуклеотиды генов VIII и *lacZ* (направленные 5'→3') в ДНК pLZ381/F помечены точками снизу и сверху. Первичные структуры остальных плазмид совпадают со структурой ДНК pLZ381/F, за исключением районов между G и A, в которые проводили встройку синтетических олигонуклеотидов. Штриховая линия указывает на полное совпадение нуклеотидной последовательности с изображенной на предшествующей строке. Число 41 означает количество нуклеотидов до кодона, терминирующего ген VIII. Терминирующий и иницирующий кодоны генов VIII и *lacZ* отмечены снизу (двойная черта) и сверху соответственно. Последовательность сайта SD_{*lacZ*} подчеркнута снизу (в случае вариантов pLZ381/4 и pLZ381 обозначена SD₁). Минорные сайты SD (SD₂ и SD') и иницирующие кодоны выделены штриховой линией. В правой колонке приведены относительные эффективности (A_2) трансляции гена *lacZ* у соответствующих pLZ381N-вариантов, нормированные на эффективность трансляции химерного белка В-βGal (принята за единицу), которую определяли по ферментативной активности β-галактозидазы (βGal) в клетках *E. coli* с плазмидой pLZ381/F

VIII-*lacZ*. Следует отметить, что химерный белок, кодируемый плазмидой pLZ381 (рис. 3), способен проявлять свойства обеих его составляющих частей: N-концевого фрагмента белка В и β-галактозидазы; оценка количества химерного белка по удельной ферментативной активности β-галактозидазы согласуется с данными независимого радиоиммунологического анализа с антителами к белку В [34].

Полученная серия плазмид (см. рис. 3) представляет собой удобную модель для исследования влияния типа сопряжения цистронов на уровень их экспрессии. Для ответа на эти вопросы проводили измерения

уровней синтеза β -галактозидазы в клетках *E. coli* CSH36 (F^-), несущих соответствующие рLZ-плазмиды. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 3.

Параллельно измерениям уровня синтеза β -галактозидазы анализировали копияность плазмид и содержание *lacZ*-специфической мРНК. Копияность плазмид оценивали по результатам определения соотношения хромосомной и плазмидной ДНК [30]. Эти измерения показали, что все полученные в работе рекомбинантные плазмиды имели в реципиентных клетках *E. coli* практически одинаковую копияность. Следует отметить, что, согласно способу конструирования (см. рис. 2), в рLZ381N-плазмидах транскрипцию искусственного оперона IX-VIII-*lacZ* контролирует один и тот же промотор, гарантируя тем самым равное количество соответствующих полицистронных мРНК. Для учета возможного снижения доли *lacZ*-мРНК в случае произвольной терминции полицистронного транскрипта в вариабельной части ДНК рLZ381/N, расположенной в районе синтетических вставок, определяли относительное содержание специфической мРНК. Оказалось, что все рLZ-плазмиды в данных экспериментальных условиях обеспечивают практически одинаковое количество *lacZ*-мРНК и поэтому наблюдаемые различия в уровнях синтеза β -галактозидазы в клетках, несущих различные рLZ-плазмиды, определяются только эффективностью трансляции гена *lacZ*, из чего следует, что существует структурно-функциональная зависимость между эффективностью экспрессии цистрона *lacZ* и организацией межцистронного участка, разделяющего гены VIII и *lacZ*.

Можно представить несколько особенностей организации межцистронной области, способных влиять на уровень экспрессии гена *lacZ*. Во-первых, различия в экспрессии гена *lacZ* могут быть результатом негативного действия пространственной структуры этого района мРНК. Во-вторых, для инициации трансляции β -галактозидазы существенное значение имеет взаимное расположение терминаторного кодона цистрона VIII и сигналов SD-AUG гена *lacZ*, поскольку вообще событие терминции на цистроне C_i может влиять на процесс инициации цистрона C_{i+1} . В-третьих, в контексте 3'-конца матрицы цистрона VIII могут встречаться дополнительные сигналы, обеспечивающие инициацию трансляции в других рамках. Эти сигналы могут приводить к положительной или отрицательной интерференции* между рибосомами в районе SD-AUG *lacZ*-гена. В-четвертых, возможно существование таких особенностей структуры участка инициации трансляции полусинтетического гена *lacZ*, как альтернативные сайты инициации с использованием различных комбинаций SD-AUG, что было отмечено для некоторых вариантов природного гена *lacZ* [35]. В-пятых, в результате изменений рамки трансляции 3'-концевой части цистрона VIII (рис. 3) рибосомы на этом участке считают другие кодоны. Эффективность же трансляции мРНК (как следствие, скорость движения рибосомы по матрице) зависит как от наличия редких кодонов [36, 37], так и от текста матрицы — взаимного расположения кодонов [38].

При анализе 3'-концевых последовательностей цистрона VIII мы не обнаружили редких кодонов, поэтому в данном случае пятая особенность организации участка стыка генов VIII и *lacZ*, вероятно, не существенна.

На рис. 4 приведены возможные вторичные структуры мРНК в области участка инициации трансляции гена *lacZ*. Во всех случаях нуклеотидная последовательность сайта SD_{lacZ} образует стабильную вторичную структуру и, по-видимому, не доступна для прямого связывания с рибосомной 30S субчастицей, которое необходимо для образования иницирующего комплекса [40]. Следовательно, разрушение вторичной структуры мРНК этого района необходимо для инициации трансляции гена *lacZ* у всех вариантов рLZ381N. При этом скорость восстановления вторичной

* Термин «интерференция» использовал нами для описания процесса взаимодействия между рибосомами или между полной рибосомой и 30S субчастицей, который может влиять на эффективность инициации трансляции.

структуры, разрушенной действием транслирующей рибосомы, должна влиять на эффективность инициации. Например, увеличение времени формирования вторичных структур матриц в области SD-AUG гена *lacZ*, транскрибированных с плазмид pLZ381/23A и pLZ381/19A, по сравнению с pLZ381/23B и pLZ381/19B (рис. 4) могло бы быть причиной наблюдаемых различий в уровнях синтеза β -галактозидазы.

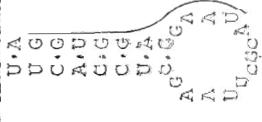
Плазмиды серии pLZ381N различаются взаимным расположением терминирующего и иницирующего сигналов трансляции цистронов VIII и *lacZ*. В случае плазмид серии pLZ381/*KpnI*⁻, представляющих пример первого типа взаимного расположения цистронов, определяемые ими уровни синтеза β -галактозидазы практически равны количеству химерного белка B- β -Gal (рис. 3, плазмиды pLZ381/F, pLZ381/*KpnI*⁻, pLZ381/23A и pLZ381/23B), т. е. соответствуют уровню трансляции цистрона VIII (см. выше). Эти данные можно объяснить, предположив следующий механизм: рибосома, транслирующая цистрон VIII, хотя и разрушает вторичную структуру мРНК района SD_{*lacZ*}, сама при этом закрывает его, что делает невозможным связывание новой 30S субчастицы с иницирующим участком; после терминирования трансляции цистрона VIII на последовательности AUGA рибосома может диссоциировать или реиницировать, что в обоих случаях приводит к освобождению SD_{*lacZ*}, доступность которого для связывания со свободной 30S субчастицей будет зависеть от времени формирования вторичной структуры этого района мРНК (рис. 4а и обсуждение выше). В полицистроновых типа I, по-видимому, главным образом происходит реинициация с ближайшего иницирующего кодона. Действительно, уменьшение вероятности независимой инициации с SD_{*lacZ*}-AUG в случае плазмиды pLZ381/SD⁻, несущей deletion последовательности SD_{*lacZ*}, не приводит к изменению уровня синтеза β -галактозидазы по сравнению с pLZ381/*KpnI* и pLZ381/23B, в которых последовательности SD_{*lacZ*} не нарушены (рис. 3).

Таким образом, можно предполагать, что сопряжение цистронов типа I обеспечивает их эквимлярную экспрессию. Это предположение согласуется с нашими предварительными наблюдениями [30], а также с данными по экспрессии природных полицистронов этого типа [3, 21, 29]. Отметим, однако, что в некоторых случаях возможно небольшое увеличение уровня экспрессии C_{*i+1*}-цистрона в результате дополнительной независимой инициации трансляции с участка SD_{*i+1*}-Ini_{*i+1*}, где Ini — один из иницирующих кодонов (см., например, плазмиду pLZ381/23A, рис. 3).

Плазмиды pLZ381/19A, 19B, 1T и 1C представляют примеры III типа сопряжения цистрона (рис. 1, 3). Рибосома, транслирующая цистрон VIII, как и в предыдущем случае, разрушает вторичную структуру мРНК, закрывающую сайт SD гена *lacZ* (рис. 4б). Однако терминирование трансляции гена VIII происходит на кодоне UGA, расположенном в 41-м нуклеотиде за AUG-иницирующим триплетом гена *lacZ*. Известно, что рибосома закрывает на мРНК участок длиной 20–60 нуклеотидных остатков [40]. Следовательно, терминирование рибосомы в вариантах полицистронов типа III не препятствует инициации с открывшегося участка SD_{*lacZ*}. Этим можно объяснить увеличение уровня синтеза β -галактозидазы в клетках, содержащих плазмиду pLZ381/19B, по сравнению с клетками, несущими плазмиду pLZ381/23B (рис. 3; в случае плазмид pLZ381/19B и pLZ381/23B мРНК имеют сходные вторичные структуры — см. рис. 4б). Увеличение времени формирования вторичной структуры мРНК, разрушенной транслирующей цистрон VIII рибосомой, вероятно, приводит к повышению продукции β -галактозидазы у вариантов pLZ381/19A, 1T и 1C (рис. 3 и 4б). Следует отметить, что в случае вариантов pLZ381/19A, 19B, 1T и 1C нельзя исключить отрицательную интерференцию между транслирующими (трансляция гена VIII) и иницирующими (инициация на SD_{*lacZ*}-AUG) рибосомами. При этом в общем случае в полицистроновых, имеющих сопряжение типа III (рис. 1), процесс отрицательной интерференции, по-видимому, имеет функциональное значение, как способ понижения уровня трансляции C_{*i+1*}-цистрона по отношению к активно транслирующемуся цистрону C_{*i*}.

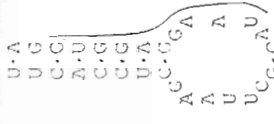
pLZ381/KpnI^r ($\Delta G -11,5$), $A_z=1$

..U AAG AAAUCCAAUGA CC AUG AU...



pLZ381/23A ($\Delta G -10,9$), $A_z=1,8$

..U AAG AAAUCCAAUGA CC AUG AU...



pLZ381/23B ($\Delta G -20,8$), $A_z=1$

..U AAG AAAUCCAAUGA CC AUG AU...



a

Рис. 4. Возможные вторичные структуры районов инициации трансляции лева *lacZ* в полицистроновых мРНК, относящихся к типам I-IV (a-e) взаимного расположения цистронов. Расчет свободной энергии шпикел (ккал/моль; дафры на рисунке) проводили, как рекомендовано в работе [39]. A_z — относительная эффективность трансляции гена *lacZ* (см. рис. 3). Нуклеотидные последовательности сайта SD_{*lacZ*} иницирующего и терминирующего концов генов *lacZ* и VIII обозначены как на рис. 3. Колонном AUU (b) отмечены отличия в нуклеотидных последовательностях мРНК, синтезируемых на плазмидах pLZ381/M- и pLZ381/4M- по сравнению с pLZ381 и pLZ381/4 соответственно

PLZ381/24B (ΔG -27,6), A_Z=10,4

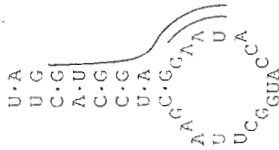
..U AAG AAA·UCCAUG ACC AUU AUU...



PLZ381 (ΔG -11,2), A_Z=22,2

(pLZ381/M⁻ (ΔG -11,2), A_Z=13,1)

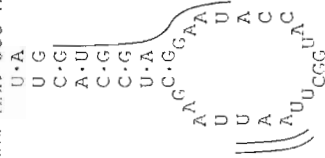
..U AAG AAA·UCC AUG ACC AUG A..



pLZ381/4 (ΔG -11,1), A_Z=27,4

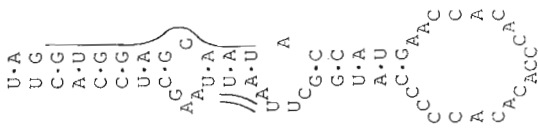
(pLZ381/4M⁻ (ΔG -11,1), A_Z=13,3)

..U AAG AAA·UCC AUG ACC AUG A..



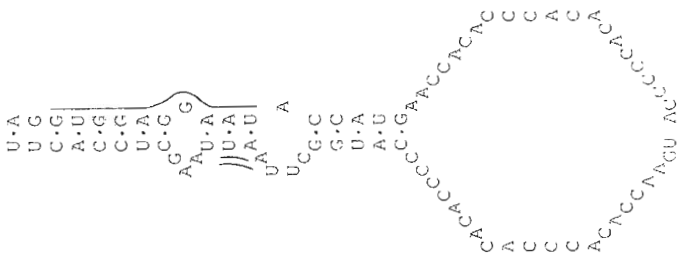
PLZ381/27A ($\Delta G -19,4$), $A_T=15,7$

..U AAG AAA-UCCAUG ACC AUG AUU..



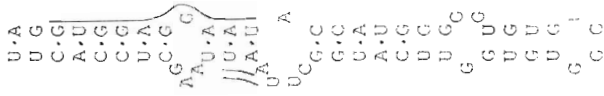
PLZ381/50 ($\Delta G -18,6$), $A_T=15,7$

..U AAG AAA-UCC AUG ACC AUG AUU..



PLZ381/27B ($\Delta G -20,8$), $A_T=2,2$

..U AAG AAA-UCCAUG ACC AUG AUU..



Рассмотрим варианты pLZ381/50 и pLZ381/27A, которые мы относим к типу IV взаимного расположения цистронов (рис. 1, 3). В ходе трансляции полицистронных мРНК, кодируемых этими плазмидами, разрушается вторичная структура и освобождается район SD_{lacZ}-AUG. Однако в отличие от полицистронов типа III в этом случае процессы терминации трансляции гена VIII и инициации трансляции цистрона *lacZ*, по-видимому, могут происходить параллельно. Это исключает возможность отрицательной интерференции между рибосомами, транслирующими цистрон VIII и иницирующими ген *lacZ* (ср. с предыдущим вариантом типа III), и, как результат, увеличивает уровень синтеза β-галактозидазы у вариантов pLZ381/50 и pLZ381/27A по сравнению с pLZ381/19A. С другой стороны, встройка между терминатором цистрона VIII и участком SD_{lacZ}-AUG SD-подобной структуры (SD') и иницирующих кодонов GUG во всех трех рамках считывания (рис. 3, плазмида pLZ381/27B), приводит к снижению уровня синтеза β-галактозидазы в клетках, несущих плазмиду pLZ381/27B, по сравнению с клетками, содержащими pLZ381/27A. По-видимому, такое падение уровня трансляции гена *lacZ* связано с отрицательной интерференцией между рибосомами, иницирующими в районах SD' и SD_{lacZ}. Кроме того, в этом случае нельзя исключить отрицательного влияния вторичной структуры, примыкающей непосредственно к SD_{lacZ}, что может уменьшать время формирования шпильки, экранирующей участок инициации гена *lacZ* (рис. 4з).

Поскольку плазмиды pLZ381/27A и pLZ381/50 обеспечивают одинаковые уровни синтеза β-галактозидазы (рис. 3), можно предположить, что в вариантах типа pLZ381/27A и pLZ381/50 уровень экспрессии цистрона *lacZ* определяется эффективностью инициации трансляции на участке SD_{lacZ}-AUG. Возможно, это свойство — основная функциональная характеристика полицистронов, относящихся к типу IV, т. е. сопряжение типа IV, по-видимому, является знаком в полицистронных матрицах, используемым для разделения генов разных групп, объединенных в единую мРНК с общим транскрипционным контролем (например, гены лизиса и морфологии в поздней мРНК бактериофага λ [26]).

Плазмиды pLZ381, pLZ381/4 и pLZ381/24B представляют пример сопряженных цистронов типа II (рис. 1, 3). По сравнению с другими вариантами сопряженных цистронов они обеспечивают более высокий уровень экспрессии гена *lacZ*. Необходимо отметить, что сравнение pLZ381/23B и pLZ381/24B, относящихся соответственно к типам I и II и имеющих похожие вторичные структуры мРНК в районе SD_{lacZ}-AUG (рис. 4а, б), свидетельствует о том, что переход от сопряжения I к сопряжению II сопровождается усилением экспрессии дистального цистрона *lacZ* по отношению к проксимальному цистрону VIII. Это согласуется с нашими предварительными наблюдениями [30, 34], а также с данными, полученными при исследовании уровней экспрессии тех природных полицистронов [3, 5], которые можно отнести к типу II.

Каковы причины усиления трансляции цистрона *lacZ* в сопряженных полицистровах типа II? Рассмотрим структурно-функциональные особенности района инициации трансляции гена *lacZ* в случае плазмиды pLZ381. Терминация трансляции цистрона VIII происходит на сайте SD_{lacZ}. Пришедшая рибосома экранирует участок инициации *lacZ* (см. выше), что должно вызывать отрицательную интерференцию между этой рибосомой и 30S субчастицей, образующей инициаторный комплекс. Можно было ожидать, что уровень синтеза β-галактозидазы в клетках, содержащих плазмиду pLZ381, не превысит таковой для плазмиды типа сопряжения IV — pLZ381/27A. Однако экспериментальные данные противоречат этому (рис. 3). Для объяснения такого противоречия рассмотрим возможное влияние рибосомы или ее 30S субчастицы на структурно-функциональную организацию матрицы в окрестности инициаторного участка гена *lacZ*.

В плазмиде pLZ381 район инициации трансляции гена *lacZ* содержит два иницирующих кодона (каждый имеет свой сайт SD). Для первого из них (ATG₁) это последовательность TAAGGAGGTG (SD₁), для второ-

го — GGA(SD₂) (рис. 3). Остановившись на терминаторе UAA, рибосома, по-видимому, прерывает инициацию трансляции, закрывая район обоих сайтов SD или по крайней мере SD₁. Для понимания роли второго AUG-кодона (AUG₂) в инициации трансляции гена *lacZ* и влияния расстояния между терминирующим и иницирующим кодонами были сконструированы плазмиды pLZ381/4, pLZ381/M⁻ и pLZ381/4M⁻ (рис. 3). Плазмида pLZ381/M⁻ отличается от pLZ381 только заменой ATG₂-кодона гена *lacZ*. Такое же различие имеют плазмиды pLZ381/4M⁻ и pLZ381/4. Замена ATG₂ на кодон ATT в начале гена *lacZ* в плаزمидах pLZ381/M⁻ и pLZ381/4M⁻ приводит практически к двукратному падению уровня синтеза β-галактозидазы по сравнению с вариантами, содержащими оба ATG-кодона (рис. 3). Это может указывать на то, что в мРНК, синтезируемых на плазмидах pLZ381 и pLZ381/4, функционируют оба сайта инициации трансляции: SD₁-AUG₁ и SD₂-AUG₂, а в случае вариантов pLZ381/M⁻ и pLZ381/4M⁻ — только один SD₁-AUG₁. Очевидно, что энергия взаимодействия 3'-конца 16S рибосомной ПНК с SD₂(GGA) значительно меньше, чем с SD₁(UAAGGAGGUG). Сильное связывание с SD₁ может привести к увеличению продолжительности взаимодействия рибосомы с районом инициации трансляции и связанным с ним уменьшением числа актов инициации трансляции гена *lacZ*. Кроме того, в мРНК, синтезируемых на плазмидах pLZ381/M⁻ и pLZ381/4M⁻, вероятно, из-за близкого расположения терминирующего кодона к сайту SD₁ и задержки рибосомы на нем, проявляется эффект отрицательной интерференции между терминирующей и иницирующей рибосомами. Поэтому возможно, что в вариантах pLZ381 и pLZ381/4 более эффективно функционирует сайт SD₂-AUG₂, чем SD₁-AUG₁.

Уровень синтеза β-галактозидазы в клетках, содержащих плазмиду pLZ381/4, приблизительно на 25% больше, чем в клетках с плазмидой pLZ381 (рис. 3). Объяснение этого факта различиями вторичных структур мРНК в районе инициации трансляции гена *lacZ* кажется маловероятным (рис. 4б). Можно предполагать, что повышение уровня синтеза β-галактозидазы в случае варианта pLZ381/4 связано с более удачным расположением терминирующего кодона цистрона VIII относительно района инициации трансляции гена *lacZ*. Во-первых, отдаление терминатора цистрона VIII на 10 нуклеотидов от начала сайта SD₁ в варианте pLZ381/4 может снижать отрицательную интерференцию между терминирующей и иницирующей рибосомами. Во-вторых, кажется вероятным, что в этом случае положение терминатора гена VIII создает стерические препятствия для инициации с кодона AUG₂, который функционирует на данной матрице достаточно эффективно (ср. на рис. 3 pLZ381/4 и pLZ381/4M⁻ или pLZ381 и pLZ381/M⁻).

Для детализации роли взаимного расположения цистронов в регуляции трансляции полицистронных мРНК следует принять во внимание данные по изучению процесса диссоциации рибосомы на терминирующем кодоне. Для некоторых случаев известно, что после терминации происходит разборка рибосом, но 30S субчастица остается некоторое время связанной с матрицей [41]. Когда это происходит на полицистронных мРНК, связанная на терминаторном участке C_i-цистрона 30S субчастица влияет на вторичную структуру матрицы и тем самым может экспонировать инициаторный район C_{i+1}-цистрона, делая его доступным для узнавания свободными рибосомами. Тогда заселенность терминирующего участка цистрона C_i зависит от времени удерживания 30S субчастицы в этом районе матрицы и от эффективности трансляции (плотность потока рибосом) этого цистрона. Эти два фактора будут определять продолжительность экспонирования (или экранирования) инициаторного участка C_{i+1}, а следовательно, и эффективность трансляции C_{i+1}-цистрона. Предлагаемый механизм, на наш взгляд, наилучшим образом объясняет различия в уровнях экспрессии гена *lacZ* в составе искусственных полицистронных мРНК, относящихся к типу II по сравнению с полицистронами типа I, III и IV.

Таким образом, в настоящей работе путем создания искусственных

полицистронов IX-VIII-*lacZ* моделированы простейшие варианты структуры организации межгенных районов, встречающихся в природных полицистроновых мРНК, а также изучено влияние взаимного расположения терминирующего и иницирующего кодонов проксимального и дистального генов на уровень трансляции дистального C_{i+1} -цистрона — гена *lacZ*. Полученные на модельной системе данные согласуются с результатами исследований уровней экспрессии генов в искусственных [30, 34, 42—44] и природных [3, 5, 21, 25, 29, 45] полицистровах, дают качественную картину роли этого фактора в управлении экспрессией генов в полицистроновых матрицах и свидетельствуют о том, что взаимное расположение цистронов в таких мРНК — важный структурно-функциональный элемент, определяющий количественные соотношения продуктов трансляции отдельных генов.

Экспериментальная часть

В работе использовали: штамм *E. coli* CSH36(F⁻); плазмиды pLZ2, pLZ4 [32] и pLZ381 [30]; рестриктазы *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *PvuII*, *BspI*, ДНК-лигазу фага T4 и дезоксирибонуклеозиды (НИКТИ БАВ, Бердск); препараты рестриктазы *KpnI* и ДНК-полимеразы I из *E. coli* (фрагмент Кленова), выделенные в лаборатории по известным методикам; дезоксирибонуклеозид-5'-[α -³²P]трифосфаты с уд. акт. 2000—3000 Ки/ммоль и [5-³H]уридин с уд. акт. 30 Ки/ммоль (Amersham, Англия); дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты, *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, X-gal, АТФ и ампициллин (Sigma, США); лецитин и дрожжевой экстракт (Difco, США). Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе System 1 (Beckman, США), как описано в работе [42].

Общие сведения об эксперименте (условия обработки ДНК различными ферментами при получении рекомбинантных плазмид *in vitro*, электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в ПААГ, выделение фрагментов из геля, трансформация клеток *E. coli* плазмидой, выделение плазмидной ДНК, выращивание плазмидосодержащих клеток и анализ нуклеотидной последовательности ДНК) описаны в работе [42].

Определение активности β -галактозидазы. Индивидуальные клоны (не менее трех для каждого варианта), полученные трансформацией клеток *E. coli* CSH36 (F⁻) pLZ381N-плазмидой, засевали в 50 мл LB-среды, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, и выращивали на качалке (100 об/мин) в течение 14 ч при 37° С. Из приготовленных таким образом культур отбирали аликвоты (0,5—1 мл), разбавляли в 5 раз охлажденной во льду свежей LB-средой, и из этих проб брали аликвоты (от 10 до 100 мкл, по три аликвоты для каждой пробы) для определения активности β -галактозидазы. Ферментативную активность β -галактозидазы определяли и рассчитывали по Миллеру [46].

Определение количества *lacZ*-мРНК в клетках *E. coli*. Ночную культуру *E. coli* (использовали клетки, несущие плазмиды серии pLZ381N или плазмиду pSK381 [34], а также без плазмиды) засевали (1:200) в свежую среду M9 [46], содержащую ампициллин (100 мкг/мл), пролин (20 мкг/мл) и витамин В₁ (1 мкг/мл), и выращивали до поглощения 1 ОЕ₅₅₀/мл. К 1 мл такой культуры добавляли 30 мКи [5-³H]уридина, инкубировали 3 мин, быстро охлаждали во льду и клетки собирали центрифугированием. Метеновую РНК из клеток выделяли, как описано в работе [47]. Для сохранения нативности РНК в используемые для экстракции растворы добавляли суммарную дрожжевую РНК до концентрации 50 мкг/мл. Копечный препарат РНК, растворенный в 30 мкл 10 мМ трис-НСl, рН 7,0, с 1 мМ EDTA, использовали для гибридизации с 2 мкг фрагмента *Clal*I-2243 (фрагмент выделен из ДНК плазмиды pUR 290, содержащей ген *lacZ* [48]), который денатурировали и наносили на нитроцеллюлозный фильтр (NAWR, 0,45 мкм, Millipore), как описано в работе [47].

Гибридизацию проводили при 65° С с четырьмя концентрациями [³H]РНК (использовали от 1 до 6 мкл раствора [³H]РНК, что соответствовало ~100 000 имп/мин) в условиях, описанных ранее [47]. В качестве контролей использовали фильтры без ДНК (неспецифическое связывание не превышало 10 имп/мин) и [³H]РНК, выделенную из клеток с плазмидой pSK381 (фон в этом случае составлял ~20—30 имп/мин). Количество гибридизующейся *lacZ*-мРНК выражали в процентах от суммарной [³H]РНК (минимальное количество гибридизующейся РНК, которое принимали в расчет, 100 имп/мин). В случае клеток *E. coli*, содержащих различные плазмиды серии pLZ381N, было найдено, что количество *lacZ*-мРНК было практически одинаковое и составляло в среднем 0,025% от суммарной [³H]РНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology. V. 19. / Eds Cohn W. E., Volkin E. N. Y.: Acad Press. 1976.
2. Weismann C., Billeter M. A., Goodman H. M., Hidley J., Weber H. // Ann. Rev. Biochem. 1973. V. 42. P. 303—328.
3. Hohn T., Katsura I. // Current topics in immunology and microbiology. V. 78. Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1977. P. 69—110.

4. Yates J. L., Arfstein A. E., Nomura M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 4. P. 1837-1841.
5. Mooi F. R., Classen I., Bakker D., Kuipers H., Graaf F. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 6. P. 2443-2457.
6. Shine J., Dalgarno L. // Nature. 1975. V. 254. № 5495. P. 34-38.
7. Steitz J. A., Sprague K. U., Steege D. A., Yuan R. C., Laughrea M., Moore P. B., Wahba A. J. // Nucleic Acids-Protein Recognition / Ed. Vogel H. J. N. Y.: Acad. Press. 1977. P. 491-508.
8. Nomura M., Jinks-Robertson S., Miura A. // Interaction of Transcription and Translation Control in the Regulation of Gene Expression / Eds Grunberg-Manago M., Safer B. N. Y.: Elsevier Sci. Publ. Com. Inc. 1982. P. 91-104.
9. Shea M. A., Ackers G. K. // J. Mol. Biol. 1985. V. 181. № 2. P. 211-230.
10. Yates J. L., Nomura M. // Cell. 1980. V. 21. № 2. P. 517-522.
11. Yates J. L., Nomura M. // Cell. 1981. V. 24. № 1. P. 243-249.
12. Dean D., Yates J. L., Nomura M. // Cell. 1981. V. 24. № 2. P. 413-419.
13. Lodish H. F., Robertson H. D. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1969. V. 34. P. 655-673.
14. Steitz J. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. № 7. P. 2605-2609.
15. Stanssens P., Remaut E., Fiers W. // Gene. 1985. V. 36. № 3. P. 211-223.
16. Dunn J. J., Studier F. W. // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. № 2. P. 447-535.
17. Dunn J. J., Studier F. W. // J. Mol. Biol. 1984. V. 175. № 1. P. 111-112.
18. Studier F. W., Moffatt B. A. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189. № 1. P. 113-130.
19. Belfort M. // Gene. 1980. V. 11. № 1. P. 149-155.
20. Oppenheim A. B., Gottesman S., Gottesman M. // J. Mol. Biol. 1982. V. 158. № 3. P. 327-346.
21. Schumperli D., McKenney K., Sobieski D. A., Rosenberg M. // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 865-871.
22. Oppenheim D. S., Yanofsky C. // Genetics. 1980. V. 95. № 2. P. 785-795.
23. Baughman G., Nomura M. // Cell. 1983. V. 34. № 3. P. 979-988.
24. Cone K. C., Steege D. A. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 4. P. 725-732.
25. Berkhout B., Van Duin J. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 19. P. 6955-6967.
26. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. № 4. P. 729-773.
27. Fiers W., Contreras R., Dueriuck F., Haegeman G., Iscrentant D., Merregaert J., Min You W., Molemans F., Raeymaekers A., Van den Berghe A., Volckaert G., Yscbaert M. // Nature. 1976. V. 260. № 5558. P. 500-507.
28. Beremand M. N., Blumenthal T. // Cell. 1979. V. 18. № 1. P. 257-266.
29. Yanofsky C., Platt T., Crawford I. P., Nichols B. P., Christie C. E., Horowitz H., Vancleemput M. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 24. P. 6647-6668.
30. Кравченко В. В., Шамин В. В., Гилева И. П., Луговой В. А., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 3. С. 745-748.
31. Wezenbeck P., Hulsebos T., Schoenmakers J. // Gene. 1980. V. 11. № 1/2. P. 129-148.
32. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Нгуен К. В., Подладчиков О. И., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чувило С. А., Колосов М. Н. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1285-1289.
33. Fowler A. V., Zabin I. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 23. P. 14354-14358.
34. Гилева И. П., Мизенко Г. А., Серпинский О. П., Аммосов А. Д., Кравченко В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 3. С. 734-737.
35. Munson T. M., Stormo G. D., Niece R. L., Reznikoff W. S. // J. Mol. Biol. 1984. V. 177. № 4. P. 663-683.
36. Burns D. M., Baecham I. R. // FEBS Lett. 1985. V. 189. № 2. P. 318-324.
37. Maruyama T., Gojobori T., Aota Scin-Ichi, Ikemura T. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. Suppl. P. 151-190.
38. Shpaer E. G. // J. Mol. Biol. 1986. V. 188. № 4. P. 555-564.
39. Jacobson A. B., Good L., Simonetti J., Zuker M. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 1. Part 1. P. 45-52.
40. Спиринов А. С. Структура рибосом и биосинтез белка. Пуццино, 1984.
41. Martin J., Webster R. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 20. P. 8132-8139.
42. Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувило С. А., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1186-1193.
43. Johnston S., Lee J.-H., Ray D. S. // Gene. 1985. V. 34. № 2-3. P. 137-145.
44. Schonher B. E., Hsiung H. M., Belagaje R. M., Mayne N. G., Schonher R. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 17. P. 5403-5407.
45. Berkhout B., Kastelein R. A., Van Duin J. // Gene. 1985. V. 37. № 1-3. P. 171-179.
46. Miller J. H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1972.
47. Кравченко В. В., Гилева И. П., Гусев В. А., Серпинский О. П. // Молекулярн. биология. 1982. Т. 16. № 3. С. 511-518.
48. Ruther U., Müller-Hill B. // EMBO J. 1983. V. 2. № 10. P. 1791-1794.

Поступила в редакцию
15.X.1987
После доработки
28.III.1988

TRANSLATION EFFICIENCY OF DISTAL GENE POLYCISTRONIC
mRNA DEPENDS ON MUTUAL ARRANGEMENT
OF REGULATORY SIGNALS OF TEMPLATE

KRAVCHENKO V. V., SHAMIN V. V., GILEVA I. P.,
LIKHOŠVAJ V. A., DOBRYNIN V. N.*, FILIPPOV S. A.*,
KOROBKO V. G.*

Institute of Biologically Active Compounds, Berdsk;
* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,*
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The role of the translational terminator and initiator signals arrangement for two adjacent genes in polycistronic mRNA has been studied. Semisynthetic β -galactosidase gene (*lacZ*) of *E. coli* and fragment of phage M13 DNA (with promoter P_{VIII}, gene IX, and part of gene VIII) were used for constructing of the IX-VIII-*lacZ* artificial polycistronic operon. Cloning of the constructs into pBR322 vector resulted in a number of pLZ381N plasmids differing by the mutual arrangement of gene VIII translation terminator codon and SD site and initiator codon (SD-ATG-region) of *lacZ* gene. The mutual arrangement of gene VIII terminator codon and SD_{lacZ} - ATG region has been altered by means of deletions and insertions that have not affected *lacZ* translation initiation signals. The β -galactosidase (β -Gal) synthesis in *E. coli* harbouring different types of pLZ381N plasmids has been found to depend on type of cistron coupling (gene VIII and *lacZ*). The overlapping of terminator and initiator codons (ATGA) for genes VIII and *lacZ* (type I of polycistrons) provide approximately equal translational level for both cistrons. On the other side, levels of β -Gal synthesis in case of polycistrons type II (gene VIII stop-codon position at the beginning of SD_{lacZ} or 10 nucleotides upstream) were 20-30 times as high as for type I. Differences in β -Gal levels have also been found for variants of VIII - *lacZ* coupling in types IV and III polycistrons (the SD_{lacZ} - ATG region in 27-50 nucleotides downstream from the proximal cistron VIII stop-codon, which, in turn, is 41 nucleotides upstream this terminator). These data cannot be explained on the basis of possible secondary structure including the SD_{lacZ} - ATG region and other parts of polycistronic mRNA. In all these cases similarly stable stem-loop structures have been found. Therefore, the arrangement of the translation termination and initiation signals for two adjacent genes in essential for distal gene translation efficiency. One can imagine that ribosome or its 30S subpartical, stalling on the proximal gene terminator codon, affects the distal gene translation initiation.