



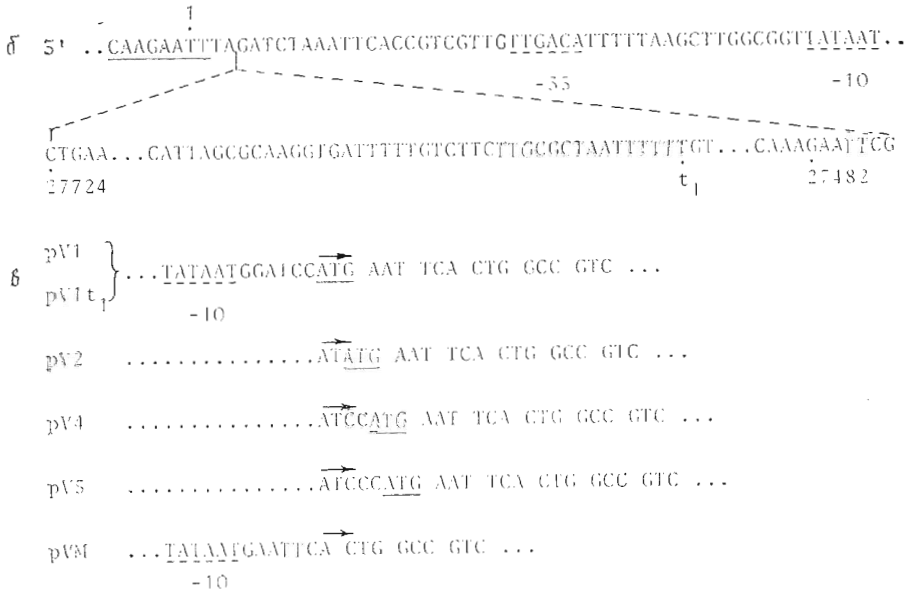
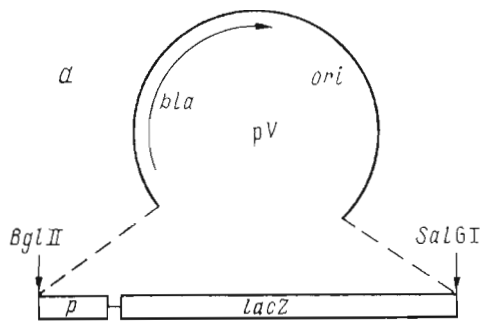
УДК 547.963.32+577.21

ПОЛОЖЕНИЕ ИНИЦИИРУЮЩЕГО КОДОНА AUG ОТНОСИТЕЛЬНО
5'-КОНЦА мРНК ВЛИЯЕТ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСЛЯЦИИ
В КЛЕТКАХ *E. COLI*Гравченко В. В., Гилева И. П., Добрынин В. Н.*,
Филиппов С. А.*, Коробко В. Г.*Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт
биологически активных веществ, г. Бердск;*Институт биорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Ген β-галактозидазы *E. coli* (*lacZ*) с делецией последовательности, кодирующей первые четыре N-концевые аминокислоты, и синтетический фрагмент ДНК с последовательностью канонического промотора были использованы для создания искусственного оперона. Искусственный оперон клонировали в плазмиде pBR322 с получением набора плазмид, кодирующих мРНК, различающиеся положением иницирующего кодона AUG гена *lacZ* относительно 5'-конца матрицы. Вариации положения AUG-кодона осуществляли путем встройки различных синтетических олигонуклеотидов. Показано, что эффективность синтеза β-галактозидазы в клетках *E. coli* зависит от положения триплета AUG относительно 5'-конца мРНК. Максимальный уровень синтеза β-галактозидазы наблюдали в случае расположения AUG-кодона непосредственно на 5'-конце матрицы. В остальных случаях уровень синтеза уменьшался, но не становился нулевым по мере отдаления иницирующего кодона на два, четыре и пять нуклеотидов от начала *lacZ*-мРНК.

Согласно современным представлениям, чтобы иницировать трансляцию в клетках *E. coli*, мРНК должна содержать иницирующий кодон AUG (гораздо реже GUG или UUG) и последовательность, которая комплементарна основаниям 3'-концевого участка 16S рибосомной РНК [1]. Шайн и Дальгарно первыми постулировали необходимость такой гомологии мРНК [2]. Такого рода последовательности (последовательности Шайн — Дальгарно (SD), как их принято теперь называть) были обнаружены практически у всех мРНК *E. coli* [1]. Идентифицированные SD-последовательности имеют длину от 3 до 9 нуклеотидных звеньев и располагаются в мРНК перед иницирующим кодоном на расстоянии 3—12 нуклеотидов [3]. В единственном случае, известном в настоящее время, мРНК репрессора *sl* бактериофага λ, транскрибируемая с промотора *p_{RM}*, не имеет последовательности SD перед иницирующим кодоном [4, 5]. Эта матрица содержит непосредственно на 5'-конце триплет AUG, с которого *in vivo* происходит инициация трансляции белка-репрессора [4]. Отсутствие других примеров мРНК, иницирующих трансляцию по такому принципу, не позволяет интерпретировать этот феномен как общее свойство прокариотических рибосом, характеризующее их способность образовывать инициаторный комплекс с участием только кодона AUG.

С целью изучения закономерностей инициации трансляции рибосомной *E. coli* матриц, не содержащих последовательности SD, в настоящей работе получена серия плазмид, транскрипция которых дает мРНК, содержащие в различных положениях 5'-концевой области кодон AUG в рамке считывания с кодирующей частью гена *lacZ*, и по уровню синтеза β-галактозидазы определена эффективность трансляции этих мРНК в клетках *E. coli*. В качестве тест-гена был выбран *lacZ* по следующим причинам: 1) количество продукта гена *lacZ* — β-галактозидазы — легко измеряется по ферментативной активности [6]; 2) вставки дополнительных кодонов, разнообразные замены и делеции в проксимальной части гена *lacZ*, приводящие к вариациям N-концевой части β-галактозидазы, практически не изменяют ее ферментативную активность [7, 8].



Организация плазмид серии pV-a — общая схема структурной организации, стрелками показаны уникальные сайты расщепления рестриктазами; б — нуклеотидная последовательность промоторной области; нуклеотидные остатки, принадлежащие вектору pBR322, подчеркнуты, а цифрой 1 отмечен первый нуклеотидный остаток в соответствии с работой [12]. В случае плазмиды pV1t₁ перед промотором имеется также вставка фрагмента ДНК бактериофага λ с терминатором транскрипции (место терминатора pV1t₁ указано по данным работ [13, 14]); цифрами указаны координаты терминаторного фрагмента по полной структуре ДНК бактериофага λ [15]; в — строение сконструированных генов lacZ в районе старта транскрипции lacZ-мРНК (показан стрелкой). Подчеркнуты инициирующие кодоны. Штриховой линией отмечены области -10 и -35 промотора [9, 11]

Семейство искусственных генов lacZ было получено путем клонирования синтетического промотора [9] в плазмиде pLZ2, содержащей ген lacZ с делецией первых 15 пар оснований в его проксимальной кодирующей части [10]. Для вариации 5'-концевой последовательности мРНК гена lacZ и обеспечения ее инициирующим триплетом AUG использовали синтетические олигонуклеотиды, которые встраивали между промотором и кодирующей частью гена. Фиксированное положение точки инициации транскрипции полученных вариантов гена lacZ достигали использованием канонического промотора, содержащего «идеальные» сигналы для узнавания РНК-полимеразой E. coli (области -35 и -10 [9]), а также каноническую структуру области старта транскрипции CAT [11]. На рисунке приведены обобщенная структура полученных таким способом плазмид серии pV и нуклеотидные последовательности этих ДНК в окрестности стыка синтетического промотора и начала структурного гена lacZ. Плазмиды pV1, pV1t₁, pV2, pV4 и pV5 содержат кодирующую область гена lacZ, в которой делегированы четыре N-концевых триплета. Известно, что отсутствие даже 26 N-концевых триплетов в кодирующей части

Уровни синтеза β-галактозидазы и относительное содержание *lacZ*-мРНК в клетках *E. coli*, трансформированных различными плазмидами серии pV

Плазмида	Фенотип *	Структура 5'-конца <i>lacZ</i> -мРНК	A ^{**}	Содержание <i>lacZ</i> -мРНК ^{***} , %
pV1	с	pppAUG AAU UCA CUG GCC...	500	0,15
pV1t ₁	с	pppAUG AAU UCA CUG GCC...	520	0,17
pV2	с	pppAUAUG AAU UCA CUG...	350	0,15
pV4	б/г	pppAUCCAUG AAU UCA...	40	0,16
pV5	б/г	pppAUCCAUG AAU UCA...	34	0,17
pVM	б	pppACUG GCC GUC GUU...	14	0,17
pLZ2	б	—	16	0,01

* Фенотип трансформированных клеток определяли по интенсивности окраски колоний, выращенных на LB-агаре в присутствии ампициллина и X-gal: с — синий; б/г — бело-голубой; б — белый.

** A_Z — активность β-галактозидазы в единицах Миллера [6].

*** Проценты от суммарной РНК, выделенной из соответствующих плазмидосодержащих клеток (см. «Экспериментальную часть»).

гена *lacZ* существенно не влияет на ферментативную активность β-галактозидазы [7]. Поэтому можно было ожидать, что, если рибосома способна распознавать на мРНК кодон AUG и использовать его для инициации трансляции, то клетки *E. coli* с плазмидами pV1, pV1t₁, pV2, pV4 и pV5 будут способны к синтезу β-галактозидазы в отличие от клеток с плазмидой pVM, так как кодируемая pVM *lacZ*-мРНК не содержит иницирующего кодона AUG (рисунок, б). По уровням синтеза β-галактозидазы в этих случаях была оценена эффективность инициации трансляции с кодона AUG в зависимости от его положения на 5'-конце мРНК.

Оценку уровней синтеза β-галактозидазы в клетках *E. coli*, содержащих плазмиды серии pV, проводили по фенотипической окраске трансформантов на LB-агаре в присутствии хромогенного субстрата X-gal* и измерением ферментативной активности β-галактозидазы в клетках, выращенных из соответствующих клонов. Для контроля использовали клетки *E. coli* с плазмидой pLZ2 [10], которая несет молчащий ген *lacZ*. В результате было найдено, что синяя окраска колоний убывает в ряду от pV1 до pVM (таблица). Такое фенотипическое проявление хорошо согласуется с уровнями синтеза β-галактозидазы в клетках, содержащих соответствующие плазмиды. Максимальный уровень синтеза фермента наблюдается в клетках с плазмидами pV1 и pV1t₁. В этом случае иницирующий кодон AUG расположен на 5'-конце *lacZ*-мРНК (рисунок). Удаление иницирующего триплета от 5'-конца матрицы на два нуклеотида приводит к почти 1,5-кратному падению уровня синтеза β-галактозидазы. При расположении кодона AUG на расстоянии четырех и пяти нуклеотидов от 5'-конца мРНК (варианты pV4 и pV5) наблюдается резкое падение уровня экспрессии гена *lacZ* (таблица). По уровню синтеза β-галактозидазы варианты pV4 и pV5 мало отличаются от pVM и pLZ2, превышая, однако, фоновый уровень β-галактозидазы.

Наблюдаемые различия в эффективностях трансляции гена *lacZ* могут быть обусловлены несколькими причинами: 1) вариации 5'-конца искусственного гена *lacZ* влияют на частоту инициации транскрипции с промотора и приводят к изменению содержания специфической *lacZ*-мРНК; 2) 5'-концы различных *lacZ*-специфических мРНК могут иметь неодинаковую устойчивость к экзо- и эндонуклеазной деградации; 3) область мРНК с кодоном AUG может образовывать вторичные структуры в результате взаимодействия с другими участками матрицы, делая его недоступным для инициации трансляции; 4) экспрессия гена *lacZ* может осуществляться не только за счет транскрипции с непосредственно примы-

* 5-Бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозид.

кающего синтетического промотора, но в какой-то мере за счет транскрипции с других плазмидных промоторов (например, за счет транскрипции гена *lacZ* с дальнего промотора из района *ori*, как это наблюдается в случае плазмиды pLZ4 [10]); 5) инициация трансляции с кодона AUG, расположенного на 5'-конце мРНК, происходит более эффективно, чем в случае расположения инициаторного триплета внутри матрицы.

Мы установили, что клетки *E. coli*, несущие различные рV-плазмиды, содержат практически одинаковое количество *lacZ*-мРНК (таблица), что, по-видимому, исключает первую из перечисленных причин.

Вторая причина, на наш взгляд, кажется маловероятной, поскольку в этом случае наблюдалась бы обратная картина в уровнях синтеза β-галактозидазы, а именно: рV5 должен бы обеспечивать больший уровень синтеза фермента, чем рV1. Напротив, не исключено, что нуклеазная деградация обсуждаемых мРНК приводит к появлению некоторой доли матриц, содержащих кодон AUG на 5'-конце и поэтому способных транслироваться так же, как и мРНК сI λ-репрессора [4]; доля таких деградированных *lacZ*-матриц в каждом случае разная и как следствие разный уровень синтеза β-галактозидазы.

Анализ возможных вторичных структур мРНК в области иницирующего кодона AUG гена *lacZ*, проведенного с помощью ЭВМ, не выявил существенных различий. Поэтому можно полагать, что все *lacZ*-мРНК для рV-серии имеют сходную вторичную структуру в районе иницирующего кодона гена *lacZ* и третья причина, по-видимому, в рассматриваемых случаях не имеет прямого влияния на процесс инициации трансляции соответствующих *lacZ*-мРНК.

Чтобы исключить четвертую причину, в ДНК рV1 перед последовательностью статистического промотора был встроены фрагмент длиной 242 п.о. из плазмиды рРР' [16], содержащий р-независимый терминатор транскрипции t_1 ДНК бактериофага λ [13, 14]. Ориентация терминатора t_1 в полученной плазмиде рV1 t_1 совпадает с ориентацией гена *lacZ* (см. рисунок), что с учетом эффективной терминации транскрипции на последовательности t_1 [15] исключает возможность образования *lacZ*-мРНК с других плазмидных промоторов. Уровни синтеза β-галактозидазы в клетках, несущих плазмиды рV1 и рV1 t_1 , не различаются (таблица). Следовательно, синтез β-галактозидазы, кодируемый плазмидами рV1 и рV1 t_1 , происходит за счет трансляции *lacZ*-мРНК, синтезируемой с прилегающего синтетического промотора, а транскрипция с других плазмидных промоторов не вносит существенного вклада в экспрессию гена *lacZ*.

Из обсуждаемых причин наблюдаемых различий уровней синтеза β-галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих плазмиды рV1, рV2, рV4 и рV5, по-видимому, самой существенной является пятая, а именно положение иницирующего кодона AUG в отношении 5'-конца мРНК.

Таким образом, в настоящей работе описаны примеры *lacZ*-мРНК, которые не имеют последовательности SD перед иницирующим кодоном AUG. В отличие от природной мРНК фагового репрессора сI [4, 5] эти матрицы содержат триплет AUG в различных местах 5'-концевой последовательности, что позволило обнаружить влияние расположения иницирующего кодона на эффективность трансляции мРНК в клетках *E. coli*. Механизм узнавания иницирующего триплета рибосомой, по-видимому, может иметь сходство с механизмом реинициации трансляции в полицистронной мРНК. Известно, например, что в некоторых полицистронных мРНК реинициация трансляции происходит в отсутствие последовательности SD [17, 18] и зависит от расстояния между терминирующим и иницирующим кодонами [17, 19, 20].

Уменьшение эффективности инициации трансляции с удалением стартового триплета от 5'-конца мРНК позволяет предполагать, что рибосомная 30S субчастица, участвующая в образовании инициаторного комплекса [1], имеет повышенное сродство к 5'-концу матрицы; это взаимодействие приводит к образованию комплекса, способного к эффективной инициации трансляции, по-видимому, предпочтительно в том случае,

когда мРНК начинается с последовательности AUG. В противоположность такому пути инициация трансляции с AUG-кодонов, расположенных внутри матрицы, вероятно, происходит в результате взаимодействия 30S субчастицы с мРНК путем повторяющихся случайных контактов рибосомной субчастицы с различными районами матрицы, завершающихся образованием инициаторного комплекса в случае связывания с иницирующими сигналами (SD-AUG или AUG). На наш взгляд, существование двух путей опознавания кодона AUG (на 5'-конце и внутри мРНК) могут объяснить наблюдаемые различия в уровнях трансляции *lacZ*-мРНК, кодируемых плазмидами серии pV.

Экспериментальная часть

В работе использовали: штамм *E. coli* CSH36 (F⁻) [6]; плазмиды pBRD1 [9], pLZ2 [10], pPP' [16]; рестриктазы, ДНК-лигазу фага T4, ДНК-полимеразу I из *E. coli* (фрагмент Кленова) и дезоксирибонуклеозиды (НИКТИ БАВ, Бердск); дезоксирибонуклеозид-5'-[α -³²P]трифосфаты с уд. акт. 2000–3000 Ки/ммоль и [5'-³H]уридин с уд. акт. 30 Ки/ммоль (Amersham, Англия); *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, АТР, ампициллин и X-gal (Sigma, США). Химический синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе «System 1» (Beckman, США), как описано в работе [21].

Общие сведения об эксперименте (условия обработки ДНК различными ферментами при получении рекомбинантных плазмид *in vitro*, электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в полиакриламидном геле, выделение фрагментов из геля, трансформация клеток *E. coli* плазмидами и лигзными смесями, выделение плазмидной ДНК, выращивание плазмидосодержащих клеток *E. coli*, анализ нуклеотидной последовательности ДНК) описаны в работе [21]. Расчет возможных вторичных структур РНК проводили на ЭВМ ЕС-1060 по правилам, указанным в работе [22]. Эти расчеты были нам любезно предоставлены В. А. Куличковым (ВНИИ молекулярной биологии, Новосибирск).

Определение активности β -галактозидазы (РФ 3.2.1.23) в клетках *E. coli*, несущих плазмиды, проводили в соответствии с методом, описанным в работе [18]. Для определения относительного количества специфической *lacZ*-мРНК использовали гибридизацию меченой [³H]уридином суммарной клеточной РНК с ДНК-зондом. Приготовление меченой РНК и условия гибридизации описаны нами ранее [18].

ЛИТЕРАТУРА

- Steitz J. A. // Biological Regulation and Development/Ed. Goldberg R. N. Y.: Plenum Press, 1979. P. 349–389.
- Shine J., Dalgarno L. // Nature. 1975. V. 254. N 5495. P. 34–38.
- Cren E. // Biochimie. 1984. V. 66. № 1. P. 1–29.
- Plashne M., Backman K., Humayun M. Z., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R. T. // Science. 1976. V. 194. № 4261. P. 156–161.
- Walz A., Pirrotta V., Ineichen K. // Nature. 1976. V. 262. № 5570. P. 665–669.
- Müller J. H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1972.
- Weinstock G. N., Berman M. L., Silhavy T. S. // Gene amplification and analysis. V. 3./Eds Papas T. S., Rosenberg M., Chirikjian J. G. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1983. P. 27–64.
- Fowler A. V., Zabin I. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 23. P. 14354–14358.
- Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Колосов М. Н. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 11. С. 1740–1742.
- Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Нгуен Куанг Винь, Подладчиков О. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чувило С. А., Колосов М. Н. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 1285–1289.
- Aoyama T., Takahashi M. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 11. P. 4085–4096.
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 420–428.
- Oppenheim A. B., Gottesman S., Gottesman M. // J. Mol. Biol. 1982. V. 158. № 3. P. 327–346.
- Luk K.-C., Dobrzanski P., Szybalski W. // Gene. 1982. V. 17. № 2. P. 256–262.
- Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. № 4. P. 729–773.
- Кравченко В. В., Микрюков Н. Н. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 264. № 4. С. 999–1001.
- Das A., Yanofsky C. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 11. P. 4757–4768.
- Кравченко В. В., Шамин В. В., Гилева И. П., Лихошай В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1372–1386.
- Schümperli D., McKenney K., Sobieski D. A., Rosenberg M. // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 865–871.

20. Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Лихошвай В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 3. С. 745-748.
21. Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувило С. А., Коробко В. Г. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1176-1185.
22. Jacobson A. B., Good L., Simonetti J., Zuker M. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 1. Part 1. P. 45-52.

Поступила в редакцию
21.XII.1987
После доработки
28.III.1988

**5'-TERMINI ARRANGEMENT AUG CODON
IN mRNA MEDIATES TRANSLATIONAL EFFICIENCY IN *E. COLI***

KRAYCHENKO V. V., GILEVA I. P., 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*

A semisynthetic gene for β -galactosidase (*lacZ*) and a synthetic DNA fragment containing the «ideal» promoter sequence were used for construction of an artificial operon including translation initiation codon ATG and no SD sequence. Cloning this artificial operon into pBR322 vector resulted in a number of pV plasmids; ATG positions were varied by insertions of synthetic oligonucleotides between *lacZ* coding sequence and starting point of transcription. It was found that efficiency of β -galactosidase synthesis in *E. coli* cells harbouring pV plasmids strongly depended on the relative position of AUG and mRNA 5'-end. High level of the synthesis was provided by translation of mRNA with AUG codon in 5'-terminal position. Amounts of synthesized β -galactosidase diminished with increase of the distance (2, 4, and 5 nucleotides) between 5'-end of *lacZ* mRNA and AUG codon.