



УДК 577.152.344'.03 : 577.214

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С ПОМОЩЬЮ
АНТИСМЫСЛОВЫХ РНК ГЕНОВ *htpR* И *lon* *ESCHERICHIA*
COLI В ГЕТЕРО- И ГОМОЛОГИЧНЫХ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Киселев В. И., Чистякова Л. Г., Антонов В. К.*

Институт прикладной молекулярной биологии МЗ СССР, Москва;

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

В работе исследована возможность коррекции протеолитических процессов в клетках *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. С этой целью были сконструированы рекомбинантные плазмиды, направляющие синтез антисмысловых РНК. В случае *P. aeruginosa* синтез антисмысловой РНК к *htpR*-подобному гену позволили в 2,5 раза снизить интенсивность деградации ³H-пурамициновых полипептидов при тепловом шоке. Антисмысловая РНК, комплементарная к 5'-концевой области гена *lon* *E. coli*, снижала этот же показатель до уровня, который наблюдается у мутанов *lon*⁻. Эксперименты по гибридизации позволили обнаружить в бактериях рода *Pseudomonas* гены, гомологичные генам *htpR* и *lon* *E. coli*. Это позволяет предположить, что генетическая система теплового шока организована у этих микроорганизмов сходным образом.

Катаболизм белков *E. coli* — важная составная часть всего метаболизма бактериальной клетки. В активно делящихся клетках в течение 1 ч обменивается ~7% белков [1]. При повышении температуры культивирования клеток возрастает интенсивность протеолиза. Наряду с этим регистрируется синтез определенного класса белков, так называемых белков теплового шока (БТШ). В их число входит и La-протеиназа, кодируемая геном *lon*. Синтез еще двух протеиназ (гены *groES* и *groEL*), участвующих в процессинге фаговых белков, также индуцируется температурой [2]. Экспрессия генов теплового шока регулируется на уровне транскрипции при участии белка, кодируемого геном *htpR*. Этот белок (σ -32) является фактором транскрипции, который в составе РНК-полимеразы обеспечивает избирательную транскрипцию генов теплового шока *E. coli* [3]. В мутантах по гену *htpR* в несколько раз снижена скорость деградации аномальных и чужеродных полипептидов, чем обусловлено их широкое применение при создании штаммов суперпродуцентов биологически активных полипептидов [4].

Гены теплового шока — одна из наиболее консервативных генетических систем [2]. В частности, ген, кодирующий 70-кДа БТШ животного происхождения, имеет 50% гомологии с геном *dnaK* из *E. coli* [5]. В работе [6] показано, что имеется не только структурное, но и функциональное родство между геном *dnaK* и соответствующим геном у дрожжей.

Каноническая последовательность нуклеотидов (CTGGGAATTTTCTA-GA), обнаруженная в регуляторной области всех генов теплового шока дрожофиллы, объединенная с *lacZ*-геном, придает температурозависимый характер синтезу β -галактозидазы в дрожжах, клетках обезьян и в ооцитах вьюна [7].

Однако, за исключением *E. coli*, для микроорганизмов сравнительно мало известно о структуре и принципах организации генов теплового шока, в том числе генов, ответственных за генетический контроль протеолитических процессов. Настоящая работа посвящена поиску гомологов генов *htpR* и *lon* из *E. coli* у бактерий рода *Pseudomonas* и использованию антисмысловых РНК этих генов для регуляции протеолитических процессов в гомологичных и гетерологичных генетических системах.

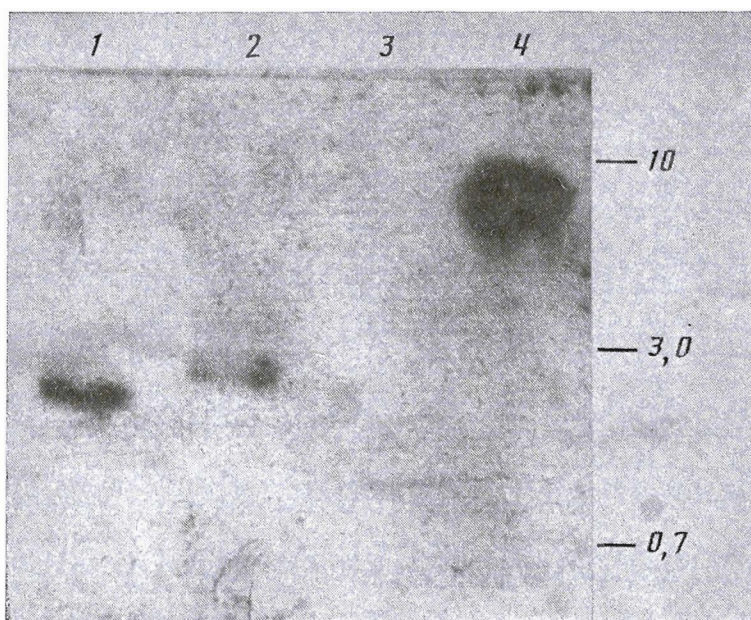


Рис. 1. Радиоавтограф нитроцеллюлозного фильтра с иммобилизованной ДНК *P. aeruginosa* (1), *P. putida* (2), *B. subtilis* (3), *E. coli* K802 (4), гидролизованной рестриктазой *EcoRI*, после гибридизации с ^{32}P -*HindIII/PvuII*-фрагментом ДНК, содержащим ген *htpR*. Размеры фрагментов ДНК указаны в тысячах пар оснований

Для поиска генов, гомологичных гену *htpR* *E. coli*, хромосомные ДНК *P. aeruginosa*, *P. putida* и *Bacillus subtilis* гидролизовали рестриктазой *EcoRI*, фракционировали в 0,8% агарозном геле, денатурировали и переносили на нитроцеллюлозные фильтры. Для гибридизации использовали меченный методом «ник-трансляции» *HindIII* — *PvuII*-фрагмент плазмиды рKV3, содержащий ген *htpR* *E. coli* [8]. Как следует из полученных данных (рис. 1), гомолог гена *htpR* содержится в геноме клеток *P. aeruginosa* и *P. putida*. Прямым доказательством функционального родства этих генов было бы получение фенотипа *htpR*⁻ у этих штаммов в случае направленного нарушения структуры *htpR*-подобного гена.

Однако, как показано в работе [9], мутация в гене *htpR* летальна для клеток *E. coli*, растущих при физиологических температурах. Учитывая это, мы попытались воздействовать на экспрессию *htpR*-подобного гена *P. aeruginosa* с помощью антисмысловой РНК. Этот генетический прием позволяет снизить экспрессию гена, сохранив минимальный, необходимый для жизнедеятельности уровень синтеза белка *htpR*. С этой целью был использован интегративный вектор (рКАР3) для бактерий рода *Pseudomonas*, который был сконструирован нами ранее [10]. Эта плазмида содержит *mob*-район плазмиды RP4, гены устойчивости к тетрациклину и хлорамфениколу (Tc^{R} , Cm^{R}) и фрагмент хромосомной ДНК *P. aeruginosa* размером 1,8 т. п. о. [10].

Если этой плазмидой трансформировать штамм *E. coli* S17, в хромосому которого встроены *tra*-оперон плазмиды RP4, то при конъюгационном скрещивании штаммов *E. coli* S17, несущих плазмиду рКАР3 с клетками *P. aeruginosa*, происходит эффективный перенос плазмид. «Спасение» плазмиды, неспособной к автономной репликации, может быть достигнуто путем ее интеграции в хромосому хозяина по типу гомологичной рекомбинации, в результате чего клетки *P. aeruginosa* приобретают устойчивость к хлорамфениколу и тетрациклину. На основе плазмиды рКАР3 была сконструирована плазмида, кодирующая синтез антисмысловой РНК, соответствующей 5'-концевой части гена *htpR*. Для этого плазмиду рKV3Cm гидролизовали рестриктазой *ClaI*. Участок узнавания этой рестриктазы расположен между промотором и SD-последовательностью

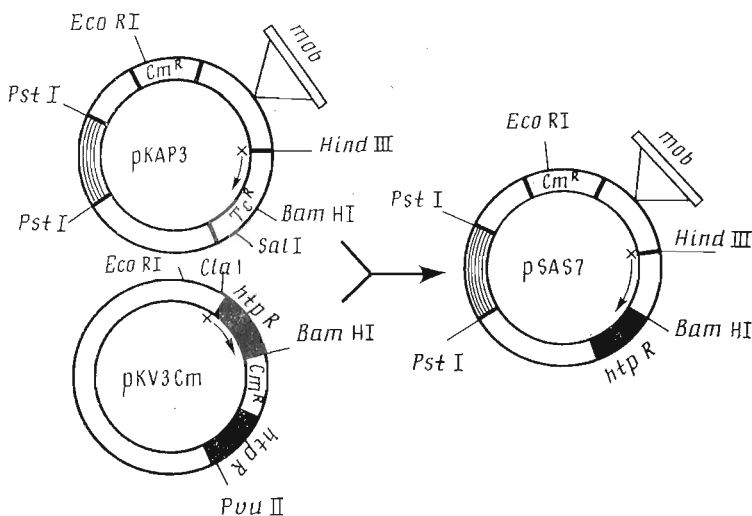


Рис. 2. Схема конструирования плазмиды pSAS7, направляющей синтез антисмысловой РНК гена *htpR* *E. coli*. Обозначены точка инициации (x) и направление транскрипции (—)

гена *htpR* [8]. Выступающие 5'-концы достраивали с помощью фрагмента Кленова в присутствии dNTP и затем плазмиду расщепляли рестриктазой *Bam*HI (рис. 2). Образующийся фрагмент ДНК размером 0,7 т. п. о, содержащий 5'-концевую область гена *htpR*, элюировали из агарозного геля.

Плазмиду pKAP3 расщепляли рестриктазой *Sal*I, липкие концы достраивали с помощью фрагмента Кленова и dNTP и после этого плазмидную ДНК расщепляли рестриктазой *Bam*HI. Полученный препарат ДНК плазмиды pKAP3 смешивали с элюированным фрагментом плазмиды pKV3Cm, лигировали и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* HB101. Поскольку клонирование в плазмиде pKAP3 по участкам узнавания рестриктаз *Sal*I и *Bam*HI должно сопровождаться нарушением гена устойчивости к тетрациклину, то для дальнейшего анализа были отобраны клоны с фенотипом Cm^R Tc^S, имеющие пониженную скорость роста при 42° С. Последний признак, как нами установлено ранее, появляется при синтезе антисмысловой РНК гена *htpR* [11]. Он характерен для *htpR*-мутантов *E. coli*.

Как показал рестрикционный анализ плазмид, выделенных из пяти термочувствительных трансформантов с фенотипом Cm^R Tc^S, все они содержали фрагмент ДНК гена *htpR*, клонированный в обратной ориентации (данные не представлены).

В полученных плазмидах транскрипция фрагмента гена *htpR* осуществляется с промотора гена Tc^R, в результате чего *in vivo* синтезируется РНК, комплементарная мРНК гена *htpR*. Об этом свидетельствует термочувствительность исследуемых бактериальных клонов и снижение скорости деградации ³H-пурамициновых полипептидов (свойства бактериальных штаммов *E. coli*, содержащих плазмиды, кодирующие синтез антисмысловых РНК к гену *htpR* описаны в работе [11]).

Одна из плазмид, обозначенная pSAS7, была использована в дальнейших исследованиях. При конъюгационном скрещивании *E. coli* S17, несущих плазмиду pSAS7, и клеток *P. aeruginosa* были получены клоны *P. aeruginosa*, устойчивые к хлорамфениколу. Большинство Cm^R-клонов имело замедленную скорость роста как при 30° С, так и при 42° С по сравнению с Cm^R-трансконъюгантами, полученными с помощью плазмиды pKAP3.

Как уже упоминалось, одним из свойств *htpR*-мутантов *E. coli* является низкий уровень протеолитической активности в условиях теплового шока [4].

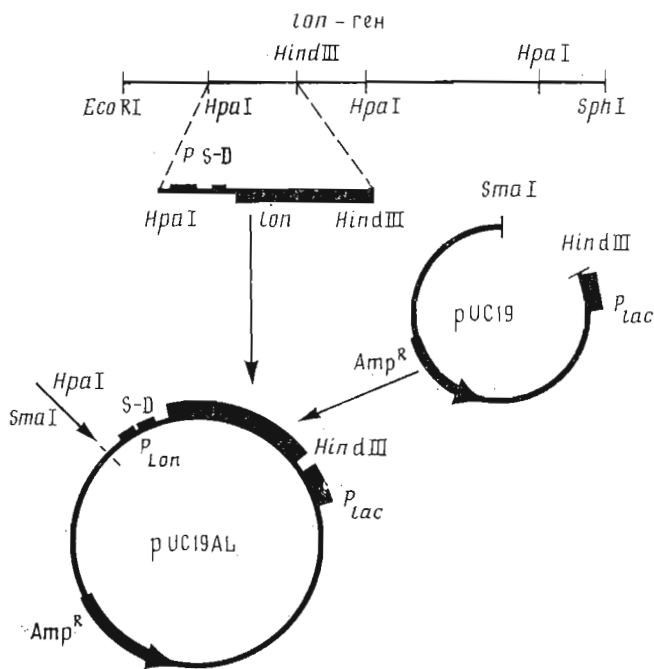


Рис. 3. Схема конструирования плазмиды pUC19AL, направляющей синтез антисмысловой РНК гена *lon* *E. coli*

Протеолитические процессы в Sm^{R} -трансконъюгантах, несущих плазмиду pSAS7, оценивали по скорости деградации ^3H -пурамициновых полипептидов, как описано Гольдбергом [1].

Скорость деградации ^3H -пурамициновых полипептидов в штамме *P. aeruginosa* с плазмидой pKAP3 возросла примерно в 3 раза при перемещении бактериальной культуры с 30 на 42° С. В трансконъюгантах *P. aeruginosa*, содержащих плазмиду pSAS7, активация протеолиза пурамициновых полипептидов при тепловом шоке была в 2,5 раза менее выражена.

Таким образом, синтез антисмысловой РНК гена *htpR* *E. coli* в клетках *P. aeruginosa* вызывает появление двух признаков, свойственных *htpR*-мутантам: термочувствительность и снижение скорости деградации аномальных белков. Вероятно, продукт *htpR* подобного гена необходим для нормальной жизнедеятельности *P. aeruginosa* не только в условиях теплового шока. Поэтому нарушение фенотипической экспрессии этого гена за счет инактивации транскрипта в дуплексе с антисмысловой РНК снижает ростовые свойства клеток и при 30° С. Поскольку инсерционное нарушение гена летально для клеток, для коррекции протеолиза у *P. aeruginosa*, видимо, необходим индуцибельный синтез антисмысловой РНК к *htpR*-подобному гену [12].

Основная роль в протеолитической деградации аномальных и гетерологичных белков в клетках *E. coli* приписывается протеиназе La [4]. Ген *lon*, кодирующий эту протеиназу, как уже упоминалось, входит в состав регулона теплового шока и подчиняется *htpR*-зависимой регуляции. Представляло интерес использовать принцип регуляции антисмысловыми РНК экспрессии гена *lon*.

Для создания плазмиды с антисмысловой последовательностью к гену *lon* нами использовался фрагмент гена *lon* из плазмиды pBRlon [13] (рис. 3). Сегмент ДНК, расположенный между сайтами узнавания рестриктаз *HpaI* и *HindIII*, содержит 5'-концевую область гена, а именно промотор, область инициации трансляции (SD-последовательность) и начало структурной части [13, 14].

Фрагмент ДНК гена *lon*, выщепляемый рестриктазами *HpaI* и *HindIII*, был клонирован в плазмиде pUC19, предварительно гидролизо-

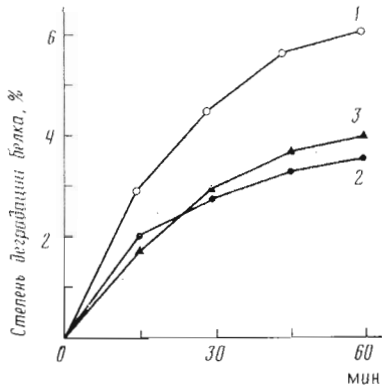


Рис. 4

Рис. 4. Скорость деградации ^3H -пурамициновых полипептидов в клетках *E. coli* АВ1157 с плазмидой рUC19 (1), АВ1899 рUC19 (2) и в клетках *E. coli* АВ1157, содержащих плазмиду с антисмысловой последовательностью рUC19АL (3)

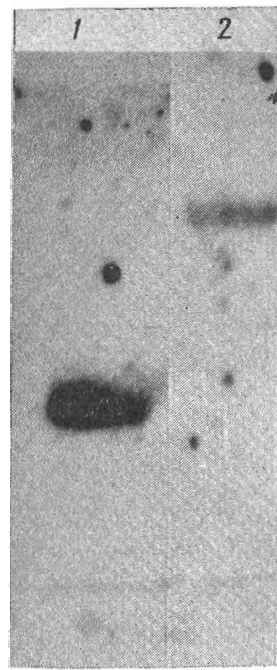


Рис. 5

Рис. 5. Радиоавтограф нитроцеллюлозного фильтра с иммобилизованной ДНК *E. coli* К802 (1), *P. putida* (2), гидролизованной рестриктазой *HpaI*, после гибридизации с ^{32}P -*HpaI* *HindIII*-фрагментом гена *lon* *E. coli*

ванной рестриктазами *SmaI* и *HindIII* (рис. 3). В полученной плазмиде рUC19АL транскрипция фрагмента гена *lon* осуществляется с промотора *lac*, в результате чего *in vivo* должна синтезироваться антисмысловая РНК. Эффективность влияния образующейся антисмысловой РНК на экспрессию гена *lon* была проверена в следующих экспериментах. Штамм *E. coli* АВ1157 трансформировали плазмидой рUC19АL, после чего оценивали по стандартной методике скорость деградации ^3H -пурамициновых полипептидов. В параллельных экспериментах подобному анализу были подвергнуты штаммы *E. coli* АВ1157 с плазмидой рUC19 и мутант *lon*⁻ АВ1899. Из полученных данных (рис. 4) следует, что скорость деградации ^3H -пурамициновых полипептидов в штамме, несущем плазмиду рUC19АL, практически приближается к таковой у *lon*-мутанта.

Гибридизация фрагмента ДНК гена *lon*, выщепляемого рестриктазами *HpaI* и *HindIII*, с препаратами хромосомной ДНК *P. putida* показала, что в геноме этих микроорганизмов содержится гомологичный ген (см. рис. 5). Эти результаты позволяют предположить, что исследуемый микроорганизм синтезирует протеиназу, аналогичную протеиназе La *E. coli*.

Таким образом, основные результаты работы дают основание предположить, что гены, ответственные за индукцию протеолиза при тепловом шоке в клетках *E. coli* и *P. aeruginosa*, имеют не только структурное, но и функциональное родство. Этот факт позволяет надеяться, что регуляция экспрессии генов *htpR* и *lon* с помощью антисмысловых РНК может стать весьма перспективным методом коррекции протеолитических процессов в бактериях рода *Pseudomonas*.

Экспериментальная часть

В работе были использованы бактериальные штаммы *E. coli* HB 101, AB 1157, AB 1899, S17, *P. aeruginosa* ML 4600 (Rif^r) и *P. putida* PAW 340 trp SM^r, *Salmonella typhimurium* NT2hisG46, химические реактивы фирм Sigma и Serva, рестриктазы фирм Boehringer и Reanal.

Плазмида pKV3, содержащая ген *htpR* *E. coli*, представлена Т. Юра (Япония, университет Киото). Плазмида pKV3cm, сконструированная нами ранее, — производная плазмиды pKV3, у которой в PstI-сайт, расположенный в средней части гена *htpR*, встроен ген *cat*, ограниченный PstI и BamHI-сайтами [10]. Плазмида pKAP3 сконструирована нами ранее [9]. Конструирование плазмиды pBR10p опубликовано в работе [13].

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочной экстракции [15]. Гидролиз ДНК сайт-специфическими эндонуклеазами, лигирование продуктов рестрикции, трансформацию бактериальных клеток, дот-гибридизацию и гибридизацию по Саузерну проводили согласно описанным методам [16]. Степень деградации пурамициновых полипептидов измеряли согласно методу Гольдберга [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldberg A. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 2. P. 422—426.
2. Neidhardt F. C., Van Bogelen R. A., Vaughn V. // Ann. Rev. Genet. 1984. V. 18. P. 295—329.
3. Grossman A. D., Erickson J. W., Gross C. A. // Cell. 1984. V. 38. № 2. P. 383—390.
4. Goff S., Goldberg A. L. // Cell. 1985. V. 41. № 2. P. 587—595.
5. Bardwell J. C. A., Craig E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 3. P. 848—852.
6. Craig E. A., Jacobson K. // Cell. 1984. V. 38. № 3. P. 841—849.
7. Wei R., Wilkinson H., Pfeifer K., Schneider C., Jong R., Guarente L. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 1. P. 8183—8187.
8. Yura T., Tobe T., Ito K., Osawa T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 1. P. 6803—6807.
9. Tsuchida T., Van Bogelen R., Neidhardt F. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 18. P. 6959—6963.
10. Асташкин Е. И., Пачкунов Д. М., Киселев В. И. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1988. № 2. С. 21—23.
11. Киселев В. И., Тарасова И. М. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. № 2. С. 454—458.
12. Tobe T., Ito K., Yura T. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 195. № 1/2. P. 10—16.
13. Америк А. Ю., Чистякова Л. Г., Остроумова Н. И., Антонов В. К., Гуревич А. И. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 408—411.
14. Gyda R. C., Stephens P. E., Hewick R., Schoemaker J. H., Reer W. J., Markovitz A. // J. Bacteriol. 1985. V. 162. № 1. P. 271—275.
15. Birnboim H. C., Doly J. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1529.
16. Маниатис Т., Фритч Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 9—445.

Поступила в редакцию
25.IV.1988

После доработки
29.III.1989

REGULATION OF PROTEOLYTIC PROCESSES BY ANTISENSE RNAs OF GENES *htpR* AND *lon* OF *ESCHERICHIA COLI* IN HETEROLOGOUS AND HOMOLOGOUS GENETIC SYSTEMS KISELEV V. I., CHISTYAKOVA L. G., ANTONOV V. K.*

Institute of Applied Molecular Biology, USSR Ministry of Health,
Moscow:

* M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Possibility of correction of proteolytic processes in cells of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* has been studied. For this purpose recombinant plasmids directing the synthesis of antisense RNAs were constructed. In *Ps. aeruginosa* the synthesis of *htpR* antisense RNA resulted in 2,5-fold reduction of the intensity of degradation of ³H-puromycin polypeptides under heat shock conditions. An antisense RNA complementary to the 5'-end of *E. coli lon* gene decreased the same index to the level observed in *lon*⁻ mutants. Genes homologous to *htpR* and *lon* genes of *E. coli* were found in *Pseudomonas* bacteria in hybridisation experiments. This finding suggests that the genetic system of heat shock in these microorganisms is organized in a similar manner.