



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.217.522

© 1990 г.

И. В. Бони, А. М. Бородин

РЕДКИЕ ИНИЦИИРУЮЩИЕ КОДОНЫ — РЕГУЛЯТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *rpoC*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Трансляция генов *rpoC Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* начинается с триплета GUG [1, 2]. Определение первичной структуры генов *rpoB* и *rpoC Pseudomonas putida*, кодирующих β - и β' -субъединицы РНК-полимеразы [3, 4], показало, что они расположены в одной рамке считывания и что трансляция β' -субъединицы потенциально может начинаться с нескольких стартовых кодонов (рис. 1).

Для точного определения стартовой точки трансляции гена *rpoC P. putida* и изучения влияния фактора IF3 на образование инициаторного комплекса был использован тоупринт-анализ [5, 6]. В его основе лежит эффект терминации обратной транскрипции 30S-субчастицей рибосом, связанной с мРНК в тройном комплексе. Тоупринт-сигналы располагаются, как правило, в положении +15 от первого нуклеотида иницирующего кодона [5].

В результате клонирования *SalI/HindIII*-фрагмента оперона *rpoBC P. putida* (1683 п. о.), включающего в себя С-концевую часть гена *rpoB* (966 п. о.), межцистронный участок и N-концевую часть гена *rpoC* [7], в векторе рGEM-4Z [8] была получена плазмида рGU-2. РНК-транскрипт, соответствующий мРНК клонированного участка оперона, получали с использованием SP6-РНК-полимеразы. В тоупринт-экспериментах применяли незаряженную тРНК_f^{Mct} и бесфакторные 30S-субчастицы рибосом *E. coli*.

Единственный стоп-сигнал, обусловленный образованием специфического инициаторного комплекса, получен для триплета UUG (рис. 2). Сходство N-концевых последовательностей β' -субъединиц РНК-полимераз *E. coli* (MKDLLKFLK) и *P. putida* (MKDLLNLLK) дополнительно подтверждает то, что иницирующим кодоном гена *rpoC P. putida* является UUG. С учетом этого длина межцистронного участка *rpoB — rpoC P. putida* составляет 63 п. о. (у *E. coli* и *S. typhimurium* — 76 п. о.), а не 30 п. о., как предполагалось ранее [2, 7].

Фактор IF3 обеспечивает специфический контроль кодон-антикодонных взаимодействий при инициации трансляции (см. [5]). В работах [9, 10]

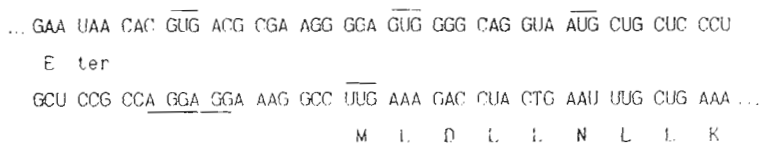


Рис. 1. Межцистронный участок генов *rpoB* и *rpoC P. putida*. Подчеркнуты сверху потенциальные иницирующие кодоны, снизу — предполагаемая SD-последовательность гена *rpoC*

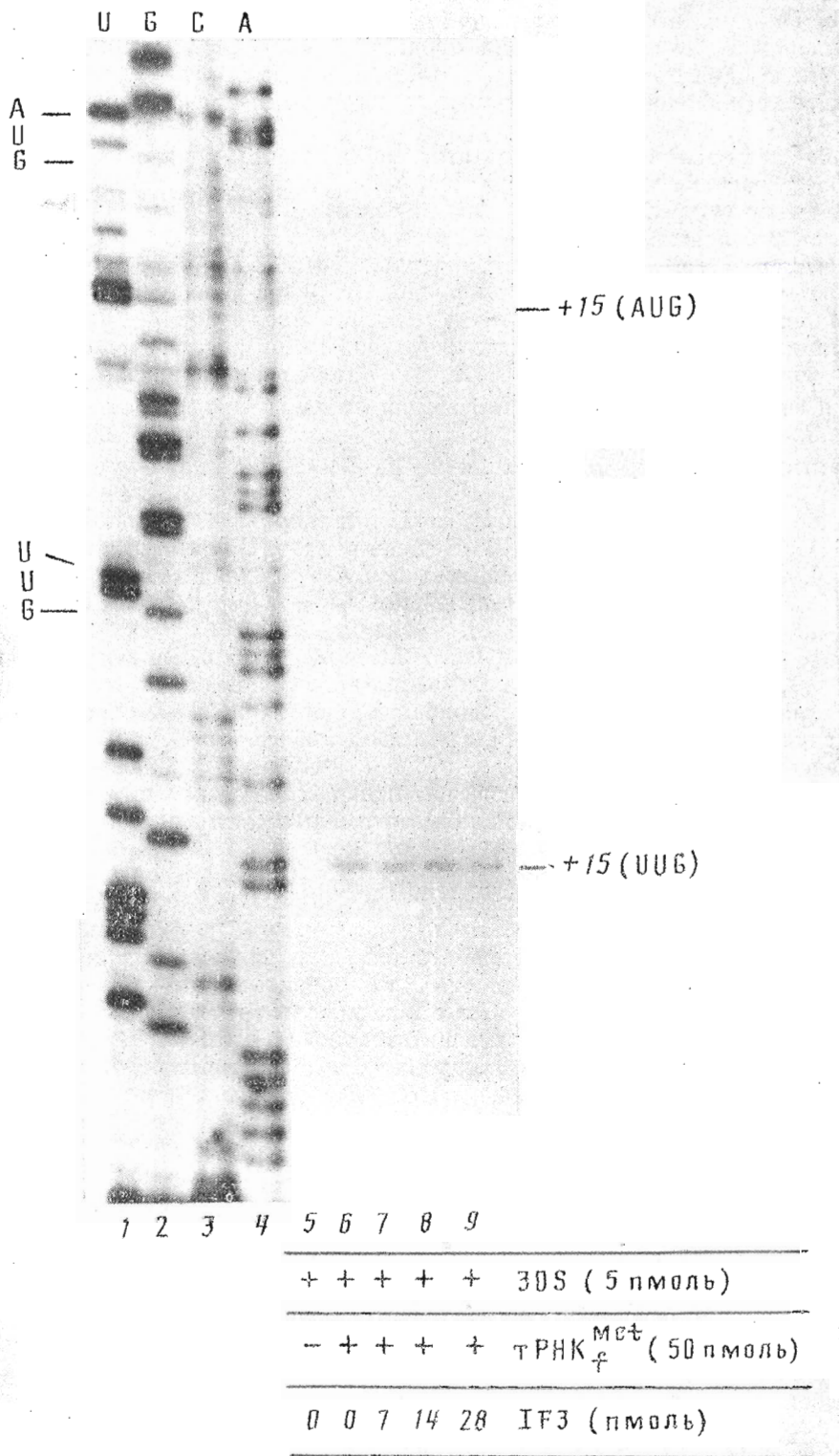


Рис. 2. Тоупринт-анализ гена *rpoC* *P. putida*. Авторадиограмма 8% ПААГ. 1-4 — секвенирование района инициации трансляции гена *rpoC* *P. putida*; 5-9 — реакция обратной транскрипции (праймер (5'-)AGGCGACGCCAGACCGAT-(3')), комплементарный участку + 62 ÷ + 79 от кодона UUG) в присутствии компонентов инициаторного комплекса (их наличие (+) или отсутствие (-) в каждом эксперименте и количество указаны в нижней части рисунка)

предполагается, что IF3 может ослаблять образование инициаторных комплексов на необычных иницирующих кодонах, в частности на кодоне UUG. Интенсивность тоупринт-сигнала пропорциональна эффективности образования инициаторного комплекса [5]. Мы показали, что фактор IF3 не вызывает ослабления тоупринт-сигнала на иницирующем кодоне UUG гена *rpoC* *P. putida* (рис. 2).

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы: 1) 30S-субчастицы рибосом *E. coli* способны узнавать сигналы инициации трансляции гетерологической мРНК *P. putida* и формировать с ней стабильные инициаторные комплексы; таким образом, инициация трансляции *P. putida* и *E. coli*, по-видимому, осуществляется с использованием сходных механизмов и регуляторных элементов; 2) инициаторные комплексы 30S-субчастиц с сайтом связывания рибосом гена *rpoC* образуются в отсутствие трансляции предшествующего гена *rpoB*, т. е. трансляция гена *rpoC* может осуществляться независимо от трансляции предшествующей рамки считывания; 3) фактор IF3 не влияет на взаимодействие тРНК_f^{Met} с кодоном UUG гена *rpoC*, откуда следует, что он не дестабилизирует кодон-антикодонные взаимодействия тРНК_f^{Met} с иницирующим кодоном UUG.

У большинства бактериальных генов иницирующим кодоном является AUG, реже используется GUG и очень редко UUG, AUA или AUU [5, 10, 11]. Среди более 600 известных генов *E. coli* найдено восемь генов с UUG в качестве инициатора: *cya* [12], *lacA* [13], *fr lysis* [10], *ndh* [14], *deoA* [15], *carA* [16], *rpsT* [17], *pnp* [18].

AUG по сравнению с GUG и UUG более эффективный иницирующий кодон [5, 19]. Однако при наличии оптимального сайта связывания рибосом инициация трансляции с кодонов, отличных от AUG, также может происходить эффективно [17, 18]. Гены *rpoC* *P. putida* и *E. coli* имеют SD-последовательности (5')-AGGAGG-(3') и (5')-GGGAG-(3') на расстоянии семи нуклеотидов от иницирующего кодона, вслед за которыми расположен триплет AAA; эти детерминанты оптимальны для инициации трансляции [5, 11, 20].

Необычные иницирующие кодоны могут быть элементами сложных систем регуляции трансляции: в гене *rpsT* кодон UUG входит в состав операторного участка ауторегуляции [21], в гене *infC* регуляция трансляции осуществляется, как предполагается [22], за счет специфических свойств иницирующего кодона AUU и продукта гена — фактора IF3. Ген *infC* *Bacillus stearothermophilus* также использует AUU [23].

Наличие различных иницирующих кодонов, GUG и UUG, в гене *rpoC* указывает на то, что регуляция уровня его экспрессии осуществляется за счет селекции иницирующего кодона как одной из детерминант инициации трансляции.

Авторы искренне благодарят В. И. Махно (ЛИЯФ АН СССР) за предоставление 30S субчастиц рибосом *E. coli*, И. П. Чернова за синтез олигонуклеотида, И. Н. Шатского за предоставление фактора IF3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Salomatina I. S., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 13. P. 4035—4044.
2. Lisitsyn N. A., Monastyrskaya G. S., Sverdlov E. D. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 177. № 2. P. 363—369.
3. Бородин А. М., Данилкович А. В., Аликметс Р. Л., Ростанцов В. М., Чернов И. П., Ажикина Т. Л., Монастырская Г. С., Сverdlov E. D. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 5. С. 1261—1265.
4. Данилкович А. В., Бородин А. М., Аликметс Р. Л., Ростанцов В. М., Чернов И. П., Ажикина Т. Л., Монастырская Г. С., Сverdlov E. D. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 303. № 3. С. 241—245.
5. Gold L. // Ann. Rev. Biochem. 1988. V. 57. P. 199—233.
6. Winter R. B., Morrissey L., Gauss P., Gold L., Hsu T., Karam J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 22. P. 7822—7826.

7. Бородин А. М., Данилкович А. В., Чернов И. П., Ажикина Т. Л., Ростанов В. М., Монастырская Г. С. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1179—1182.
8. Promega. 1987/1988 catalogue and reference guide. P. 15.
9. Berkhout B., van der Laken C. J., van Knippenberg P. H. // Biochim. et biophys. acta. 1986. V. 866. № 2/3. P. 144—156.
10. Adhin M. R., van Duin J. // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 218. № 1. P. 137—142.
11. Gold L., Stormo G. // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology / Ed. F. C. Neidhardt. Washington, D. C.: American Society for Microbiology. 1987. V. 2. OP. 1302—1307.
12. Roy A., Haziza C., Danchin A. // EMBO J. 1983. V. 2. № 2. P. 791—797.
13. Buchel D. E., Gronenborn R., Müller-Hill B. // Nature. 1980. V. 283. № 5747. P. 541—545.
14. Young I. G., Rogers B. L., Campbell H. D., Jaworowski A., Shaw D. C. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 116. № 1. P. 165—170.
15. Valentin-Hansen P., Hammer-Jespersen K., Boetius F., Svendsen I. // EMBO J. 1984. V. 3. № 1. P. 179—183.
16. Weyens G., Rose K., Falmagne P., Glansdorf N., Pierard P. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 1. P. 111—115.
17. Mackie G. A. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 15. P. 8177—8182.
18. Portier C., Regnier P. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 15. P. 6091—6102.
19. Reddy P., Peterkofsky A., McKenney K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 17. P. 5656—5660.
20. Looman A. C., Bodlaender J., Comstock L. J., Eaton D., Jhurani P., de Boer H. A., van Knippenberg P. H. // EMBO J. 1987. V. 6. № 8. P. 2489—2492.
21. Parsons G. D., Mackie G. A. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. № 1. P. 152—160.
22. Gold L., Stormo G., Saunders R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 22. P. 7061—7065.
23. Pon C. L., Brombach M., Thamm S., Gualerzi C. O. // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 218. № 2. P. 355—357.

Поступило в редакцию
13.XI.1989

I. V. BCNI, A. M. BORODIN

RARE INITIATION CODONS ARE REGULATORS OF THE *rpoC* GENE EXPRESSION

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

Translation of the *rpoC* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is known to start from the UUG codon. Now, using toeprint analysis we have shown UUG to be the initiation codon of the *Pseudomonas putida rpoC* gene. IF3 does not seem to pro-read initiation at the UUG codon. The *rpoC* genes of *P. putida*, *E. coli*, and *S. typhimurium*, which use rare start codons, have strong SD-domains AGGAGG (*P. p.*) and GGGAG (*E. c.*, *S. t.*), optimal seven-nucleotide spacing between SD and start codons, and good second codon AAA. We suggest that *rpoC* presents an unfrequent case of the regulation of translation initiation by selecting the start codon.