



УДК 577.217.35

© 1993 Н. В. Царева, М. Л. Музыченко,
И. В. БониАНАЛИЗ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ
мРНК ГЕНА *rpsA* *Escherichia coli*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Ген *rpsA* *Escherichia coli*, кодирующий рибосомный белок S1, встроен в плазмиду pGEM-3Z под контроль T7-промотора и в системе транскрипции *in vitro* синтезирована соответствующая мРНК. Методом тоу-принтинга показано, что полученная *rpsA* мРНК активна в образовании 30S-инициаторного комплекса, причем наблюдается строгая зависимость этого процесса от белка S1: лишенные белка S1 рибосомы неактивны, добавление свободного S1 приводит к эффективному образованию инициаторного комплекса, однако молярный избыток свободного белка над рибосомами блокирует процесс инициации. С помощью специфических рибонуклеаз исследована вторичная структура инициаторного района *rpsA* мРНК. На основании экспериментальных данных предложена модель структурной организации области инициации трансляции.

Ген *rpsA*, кодирующий рибосомный белок S1, расположен на 20-й мин хромосомной карты *E. coli* отдельно от кластеров генов других рибосомных белков [1]. Экспрессия *rpsA*, как и в случае других рибосомных оперонов, регулируется на уровне трансляции по принципу обратной связи, однако механизм контроля с участием белка S1 имеет существенные отличия [2]. Все другие рибосомные белки-репрессоры взаимодействуют прямо и независимо с 16S или 23S рибосомными РНК, причем соответствующие участки связывания имеют высокую степень структурной гомологии с участками мРНК, с которыми эти белки связываются при трансляционной репрессии своего оперона [3]. Белок S1 не имеет специфического участка связывания на 16S РНК в составе рибосом, он ассоциирован с 30S рибосомной субчастицей за счет белок-белковых взаимодействий [4], его РНК-связывающий домен остается свободным и непосредственно вовлечен в связывание мРНК с рибосомой при инициации трансляции [5]. В экспериментах *in vitro* свободный белок S1 в концентрациях, превышающих концентрацию рибосом, служит репрессором трансляции многих мРНК [6—8], однако *in vivo* избыток белка S1 в первую очередь блокирует трансляцию своей матрицы [2, 9].

Механизм ауторегуляции синтеза белка S1 и его связь с общей регуляторной функцией, выполняемой этим белком в процессе инициации трансляции, пока не ясны. Для изучения механизма ауторегуляции на молекулярном уровне необходимо иметь данные о структуре регуляторной области мРНК гена *rpsA*. Первичная структура гена и его 5'-концевой области, содержащей 5 промоторов и участок регуляции трансляции, известны из литературы [10, 11]. Наличие 5 промоторов предусматривает сложную систему регуляции экспрессии *rpsA*, однако имеются данные, что область, вовлеченная в аутогенный контроль, составляет не более 200 нуклеотидов в 5'-сторону от инициаторного кодона [9, 12]. Модель вторичной структуры этого района мРНК была построена с применением ком-

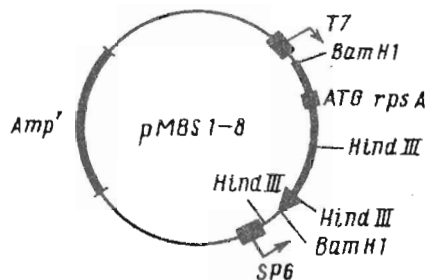


Рис. 1. Схема плазмиды pMBS1-8, содержащей ген *rpsA* *E. coli* (кодирующую область и около 200 п. о. лидерной области ([12]) под контролем T7-промотора. ATG — инициаторный кодон гена *rpsA*

пьютерных методов [9], тем не менее практика показывает, что такие гипотетические структуры могут быть далеки от реально существующих.

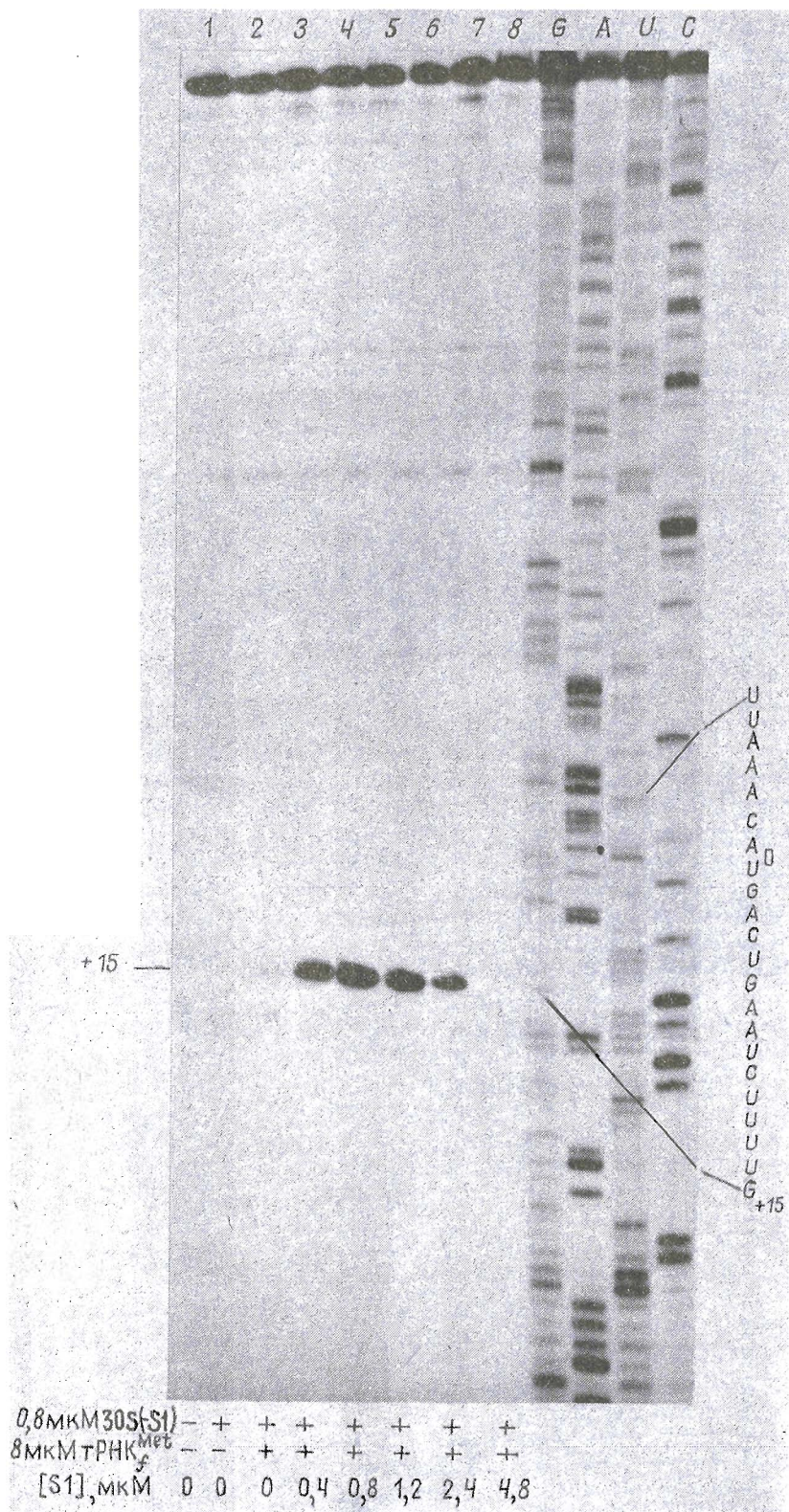
В ходе изучения механизма функционирования белка S1 в регуляции трансляции своей и «чужих» мРНК мы исследовали вторичную структуру регуляторного района мРНК *rpsA* с помощью рибонуклеаз, специфичных к однополовым и структурированным участкам РНК.

Плазмида pJS200, содержащая ген *rpsA* и его регуляторную область (около 200 п. о.), фланкированные *Bam*H1-сайтами [12], была любезно предоставлена д-ром Шниром (J. Schnier). Соответствующий *Bam*H1-фрагмент был клонирован в векторе pGEM-3Z, содержащем T7- и SP6-промоторы [13]. Ориентацию вставки относительно промоторов определяли рестриктивным анализом. Одну из полученных плазмид, pMBS1-8, в которой ген *rpsA* находится под контролем T7-промотора, использовали в дальнейшей работе (рис. 1). Плазмиду линейризовали обработкой эндонуклеазой рестрикции *Hind*III и с помощью T7-РНК-полимеразы получили РНК-транскрипт. Так как ближайший к T7-промотору *Hind*III-сайт находится в кодирующей части гена *rpsA*, полученная РНК содержала не всю, а только часть кодирующей последовательности (до положения +300). Соответствие РНК гену *rpsA* подтверждено секвенированием с помощью обратной транскриптазы и 5'-³²P-меченого праймера. В качестве праймера использовали синтетический олигонуклеотид (5')TAGCAACAACAACGCCAC, комплементарный участку +74 — +91 в кодирующей части *rpsA* мРНК.

Проверку активности полученной мРНК в инициации трансляции проводили методом «тоупринтинга» [14] с тем же праймером. Метод позволяет определить стартовую точку трансляции и эффективность образования тройного инициаторного комплекса между 30S рибосомной субчастицей, мРНК и инициаторной тРНК. В системе обратной транскрипции связанная с мРНК рибосома представляет собой барьер для обратной транскриптазы, и при анализе в структурном ПААГ в месте остановки синтеза кДНК появляется стоп-сигнал (тоупринт), положение которого обычно соответствует позиции +15 от первой буквы инициаторного кодона. Интенсивность тоупринта отражает эффективность образования тройного комплекса на исследуемой матрице.

Как видно из рис. 2, полученный фрагмент мРНК гена *rpsA* активен в инициации трансляции, причем имеет место ярко выраженная зависимость образования инициаторного комплекса от белка S1: 30S субчастицы, лишенные S1, неактивны (тоупринт отсутствует), добавление свободного белка приводит к эффективному образованию тройного комплекса, а избыток свободного S1 в тест-системе оказывает ингибирующее действие (уменьшение интенсивности тоупринта с увеличением концентрации белка). Таким образом, процесс образования инициаторного комплекса на полученной мРНК подвержен аутогенному контролю *in vitro*, и, следовательно, эта мРНК может быть использована для исследования вторичной структуры регуляторной области.

Анализ вторичной структуры *rpsA* мРНК проводили в тех же условиях, что и образование инициаторного комплекса, т. е. тестировали именно ту структуру, которая связывается 30S субчастицей и белком S1. Для идентификации одноцепочечных участков РНК использовали следующие рибонуклеазы: T2 (неспе-



цифическая, но с предпочтением к $Ar\downarrow N$ -связям), $T1$ ($Gr\downarrow N$), $U2$ ($Ar\downarrow N$), $RhuM$ ($Ar\downarrow N$, $Ur\downarrow N$). Для анализа структурированных областей применяли нуклеазу $V1$ из яда кобры. Положения разрывов в цепи РНК, вносимых в условиях статистического расщепления РНКазми, определяли с помощью метода «удлинения праймера» [15].

На рис. 3 представлен пример разделения в геле продуктов обратной транскрипции частичных гидролизатов *rpsA* мРНК, полученных при обработке РНКазми $T2$ и $RhuM$. Как видно, места остановок обратной транскрипции в точках разрывов цепи РНК легко соотносятся с определенными участками последовательности.

При разделении контрольных (не обработанных ферментами) проб также иногда наблюдаются транскрипты неполной длины (рис. 4). Это может быть следствием нескольких причин. Во-первых, разрывы могут содержаться в исходной матрице, так как РНК — «хрупкая» субстанция и следы РНКаз в реагентах или буферах могут привести к частичной деградаци при синтезе, выделении или хранении. Как правило, в этом случае в первую очередь расщепляются связи $Sr\downarrow A$ или $Ur\downarrow A$ в одностежковых экспонированных участках молекулы РНК, что также несет полезную информацию о ее структуре. Если исходная матрица не содержала разрывов (см. рис. 3), указанные связи могут частично расщепиться при инкубации контрольных образцов в условиях обработки РНКазми. Другой тип неполных транскриптов наблюдается при остановках обратной транскриптазы перед G- или C-блоками, образующими стабильные дуплексы (см. рис. 4), а также при «чтении» протяженных пиримидиновых участков.

По результатам ферментативного гидролиза было построена модель вторичной структуры *rpsA* мРНК в области, включающей район инициации трансляции (рис. 5). Вторичная структура этой области может быть представлена в виде ряда относительно коротких несовершенных спиралей (шпильки), разделенных одностежковыми участками. Петли на вершинах шпилек и участки между шпильками подвергаются атаке РНКазми (кроме $V1$) в первую очередь (см. рис. 3 и 4). Шпильки I и II достаточно стабильны при $37^\circ C$, и спаренные участки в них практически недоступны РНКазам, специфичным к открытым областям, но подвержены атаке со стороны $V1$ — РНКазы, расщепляющей структурированные участки РНК. Шпильки III и в особенности IV менее стабильны, и при достаточно глубоком гидролизе, в частности РНКазой $T1$, в них наблюдаются разрывы не только по остаткам G в петлях, но и в области стебля (рис. 4). Это свидетельствует о том, что в части молекул мРНК эта область находится в открытой конформации. Значения свободных энергий, приведенные на рис. 5, рассчитывались по программе «Вторичная структура РНК». На наш взгляд, они отражают различия в стабильности отдельных элементов предложенной вторичной структуры, которые мы наблюдали в эксперименте, хотя, безусловно, программа не учитывает многих нюансов реальной структуры, возможностей дальних взаимодействий и т. д.

Предложенная структура может рассматриваться только как первоначальная рабочая модель, которая с накоплением экспериментальных данных может быть дополнена и доработана. Уже сейчас ясно, что структуру шпильки I можно представить в двух вариантах, причем оба они учитывают полученный в экспериментах факт, что левая часть петли на вершине шпильки не расщепляется РНКазми, специфичными к одностежковым участкам, и, напротив, является мишенью для РНКазы $V1$. Один вариант (рис. 5a) предусматривает наличие так называемого псевдоузла, возникающего при спаривании левой части петли с комплементарной ей последовательностью перед стеблем шпильки I. Такие

Рис. 2. Зависимость образования 30S инициаторного комплекса на *rpsA* мРНК от белка $S1$ (тоу-принт-анализ). Авторадиограмма 8% ПААГ. G, A, U, C — сиквенсные дорожки. На A-дорожке точкой отмечена первая буква инициаторного кодона A_0 . 1—8: обратная транскрипция в присутствии компонентов инициаторного комплекса, наличие (+) или отсутствие (—) которых, а также количества указаны в нижней части рисунка. Количество мРНК в каждой реакции — 0,8 пмоль

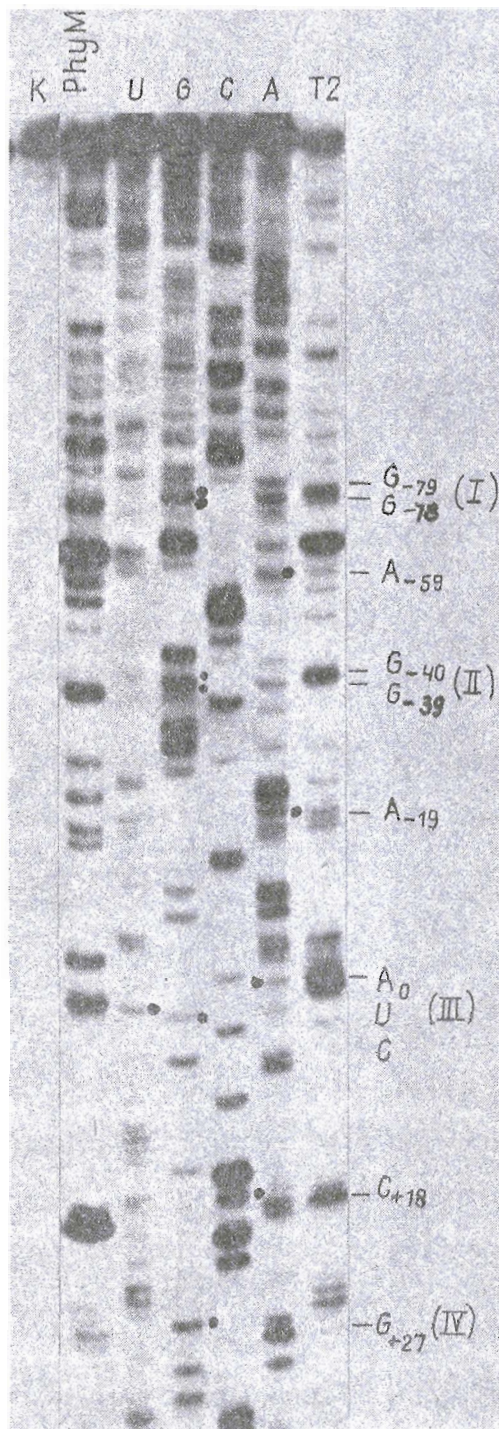


Рис. 3. Анализ вторичной структуры *grsA* мРНК в области инициации трансляции. Обратная транскрипция мРНК, частично гидролизованной РНКазами T2 (10^{-4} ед. акт.) и PhyM (0,5 ед. акт.), условия гидролиза — 7 мин, 37°C . К — контрольная мРНК, не содержащая разрывов. Точками на силовых дорожках отмечены те остатки, положение которых относительно A_0 в индикаторном кодоне обозначено справа от геля. Римскими цифрами I—IV отмечены остатки, экспонированные в петлях на вершинах выгибов

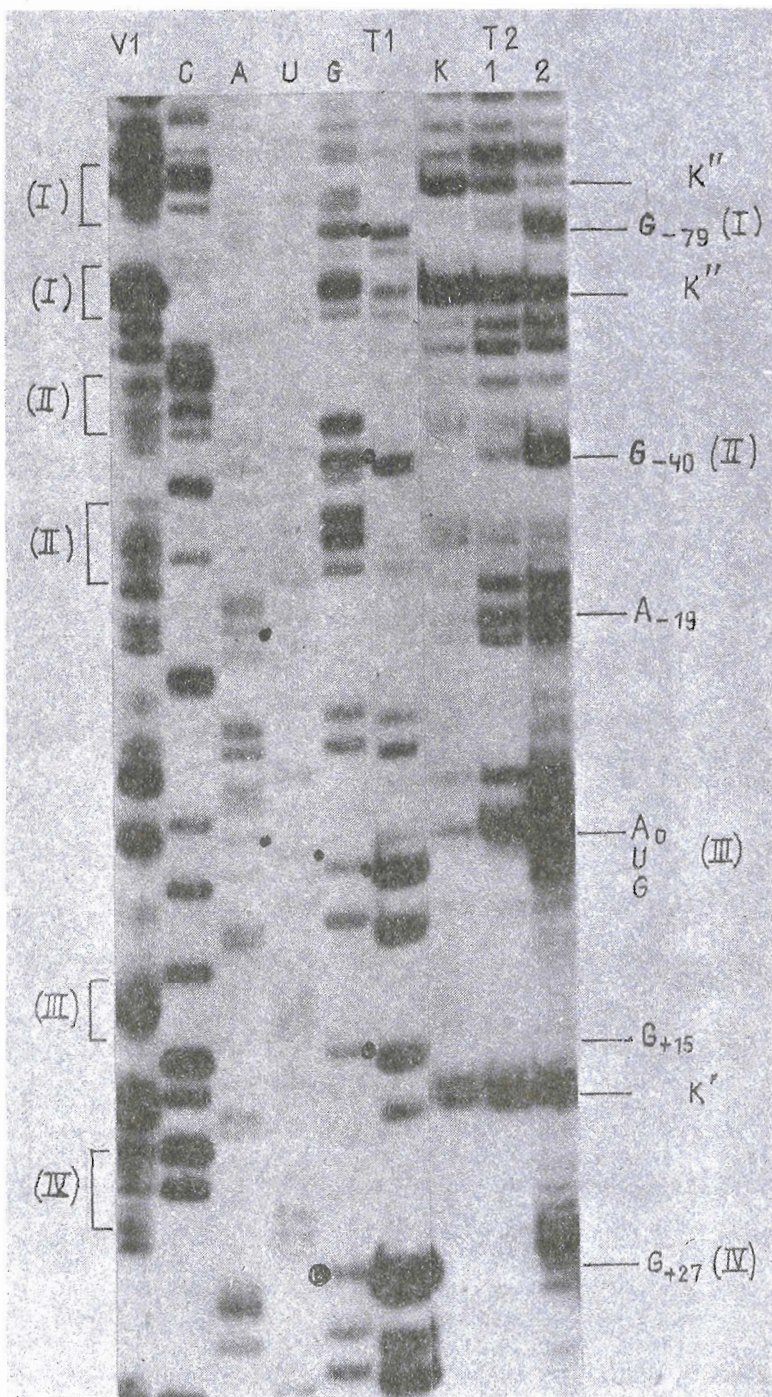


Рис. 4. Анализ вторичной структуры *grsA* мРНК в области инициации трансляции. Обратная транскрипция мРНК, частично гидролизованной РНКазами V1, T1, T2. Условия обработки: V1 — 0,45 ед. акт., 5 мин; T1 — 0,02 ед. акт., 30 с; T2 — 10^{-4} ед. акт. (1) и 10^{-3} ед. акт. (2), 1 мин. Инкубация всех проб проводилась при 37° С. К — мРНК, не обработанная РНКазами, но содержащая разрывы (K'). K'' — остановки обратной транскрипции перед G- или C-блоками. Точками на сиквенсных дорожках отмечены остатки, обозначенные в правой части рисунка. Римские цифры в скобках указывают остатки, экспонированные в петлях шпильек. В левой части рисунка отмечены участки, образующие стебли шпильек, а римские цифры указывают, какой шпильке они принадлежат

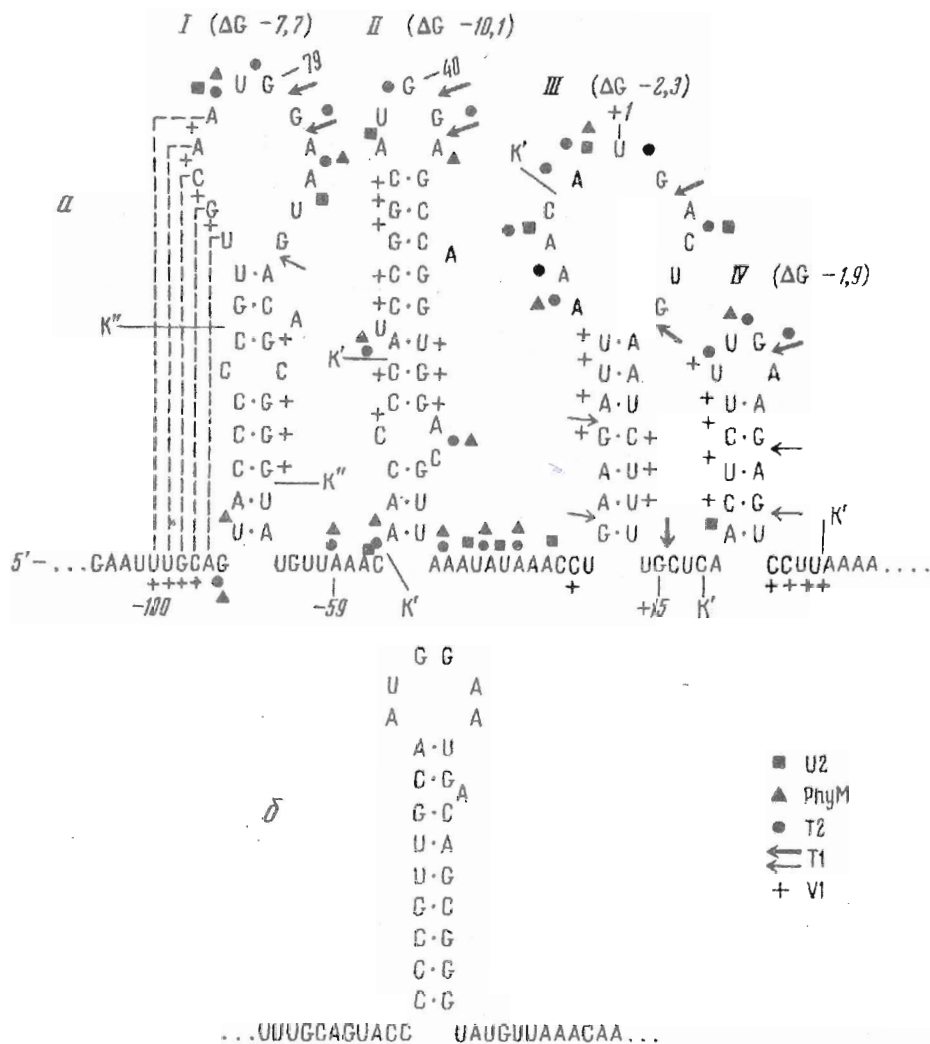


Рис. 5. Модель вторичной структуры регуляторной области *rpsA* мРНК. Места рибонуклеазных разрывов обозначены соответствующими значками. Шпильки обозначены римскими цифрами. Рядом указаны значения свободных энергий, рассчитанные по программе GeneView для каждой шпильки. а — шпилька I представлена вариантом структуры типа «псевдоузел», б — вариант шпильки I без псевдоузла. Предполагается, что остатки, подверженные атаке РНКазой V1 (слева от шпильки I), входят в состав структурированной области в 5'-сторону от представленного района РНК

элементы вторичной структуры уже описаны для функционально важных областей многих РНК [16]. Другой вариант представляет собой простую шпильку с иным распределением комплементарных оснований в стебле (рис. 5б), при этом имеется в виду, что в 5'-сторону от шпильки I существуют другие структурированные области, для уточнения структуры которых требуются специальные эксперименты. В данной работе наибольший интерес для нас представляла структура *rpsA* мРНК в непосредственной близости от инициаторного кодона.

Как известно, для эффективного связывания рибосомы с мРНК при инициации трансляции инициаторный кодон и окружающие его участки первичной структуры мРНК не должны входить в состав стабильных дуплексов [17]. Белок S1 как рибосомный белок относится к самым высокоэкспрессируемым белкам бактериальной клетки. По-видимому, само существование инициаторной шпильки III не является для рибосомы препятствием в силу ее нестабильности, к тому же

инициаторный кодон и окружающие его нуклеотиды экспонированы (см. рис. 5a). Удивительным для такого высокоэкспрессируемого белка является отсутствие сильного домена Шайна—Дальгарно (GAAG в случае S1 представляет собой очень слабый сигнал, к тому же расположенный в стебле шпильки). Это обстоятельство наводит на мысль, что у *rpsA* мРНК имеется компенсирующий дополнительный инициаторный сигнал, что может иметь непосредственное отношение к механизму регуляции его синтеза. По нашим предварительным данным, этот дополнительный инициаторный сигнал (трансляционный энхансер) расположен в однотяжевой области между шпильками II и III. Этот вопрос, а также возможный механизм аутогенной репрессии синтеза белка S1 будут рассмотрены в последующих публикациях.

Экспериментальная часть

В работе использованы следующие материалы и реагенты: эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Hind*III, T4-полинуклеотидкиназа, T4-ДНК-лигаза, тРНК_f^{Met} и суммарная тРНК *E. coli* (Boehringer-Mannheim); $\{\gamma\text{-}^{32}\text{P}\}$ ATP (Amersham), dNTP, ddNTP, рибонуклеазы V1, U2, PhyM, T1 (Pharmacia); рибонуклеаза T2 (Sankyo); РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза, AMV-ревертаза) производства Омутнинского химического завода; реактивы для гель-электрофореза (BioRad).

Получение мРНК гена *rpsA* *E. coli*. Плазмида pJS200, содержащая ген *rpsA* [12], была любезно предоставлена д-ром Шниром. *Bam*HI-фрагмент pJS200 (около 2,2 тыс. п. о) был лигирован в вектор pGEM-3Z (Promega). Ориентация вставки относительно T7/SP6-промоторов определяли с помощью рестриктоного анализа. Одну из плазмид, pMBS1-8, в которой ген *rpsA* находится под контролем T7-промотора, обрабатывали *Hind*III и мРНК синтезировали *in vitro*, используя набор реагентов и протоколы фирмы Promega (Riboprobe Gemini System II). Очищенная мРНК использовалась для дальнейших экспериментов.

Секвенирование РНК и тоупринт-анализ. Для этих целей использовали подход, называемый методом «удлинения праймера» с помощью обратной транскриптазы (primer extension) [14, 15]. Для отжига праймера с РНК при секвенировании использовали буфер: 50 mM трис-HCl (pH 8,2), 60 mM KCl, 10 mM DTT, а для тоупринт-анализа вместо KCl брали NH₄Cl и трис-HCl (pH 7,6) в тех же концентрациях. Праймер (синтетический олигонуклеотид (5')TAGCAACAACAACGCCAC, комплементарный участку +74 — +91 в кодирующей части мРНК) метили по 5'-концу ³²P в реакции с T4-полинуклеотидкиназой. Для секвенирования в отжиг брали 2 пмоль РНК и 3 пмоль меченого праймера в 10 мкл указанного буфера с добавлением 10 ед. акт. ингибитора РНКаз из плаценты человека (Promega). Стандартные для всех экспериментов условия отжига: 5 мин при 56° С с последующим постепенным охлаждением до 37° С. К 2 мкл смеси РНК—праймер добавляли 1 мкл 2 mM dNTP (смесь, содержащая все четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 2 mM каждый), 1 мкл одного из ddNTP (или 1 мкл буфера в контрольной пробе) и 1 мкл RT-смеси. Использовали следующие концентрации ddNTP (мкМ): ddATP — 250, ddCTP — 150, ddGTP — 250 и ddTTP — 200. RT-смесь (на одну реакцию): 2 ед. акт. обратной транскриптазы в буфере 50 mM трис-HCl (pH 8,2), 60 mM KCl, 10 mM DTT, 30 mM MgCl₂. Пробы инкубировали 30 мин при 37° С, после чего добавляли 5 мкл смеси: 0,05% бромфеноловый синий, 0,05% ксилендианол, 98% деионизованный формамид, 20 mM Na₂EDTA, прогревали 5 мин при 90° С и наносили на 8% структурный ПААГ.

Для тоупринт-анализа использовали 30S рибосомные субчастицы *E. coli*, приготовленные В. И. Махно (ЛИЯФ РАН, Гатчина) [18]. 30S субчастицы, лишённые белка S1 (30S—S1), и свободный белок S1 получали как описано ранее [8]. Смесь РНК—праймер (0,8 пмоль РНК), 30S—S1 субчастицы (8 пмоль), тРНК_f^{Met} (80 пмоль) и свободный белок S1 (см. рис. 2) инкубировали 10 мин при 37° С в 10 мкл буфера связывания (БС: 20 mM трис-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 1 mM

ДТТ) в присутствии 10 ед. акт. ингибитора РНКаз, после чего добавляли 1 мкл 2 мМ dNTP и 1 мкл RT-смеси (см. выше). Инкубацию продолжали еще 30 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 40 мкл раствора 0,5% SDS и 0,3 М ацетата Na, пробы обрабатывали фенолом, смесью фенол — хлороформ и осаждали этанолом. Осадки растворяли в смеси формамида с маркерами-красителями, прогревали 5 мин при 90° С и наносили на 8% структурный ПААГ.

Анализ вторичной структуры РНК с помощью рибонуклеаз. Обработку РНКазами проводили при 37° С в БС (см. выше). Каждая проба в 9 мкл БС содержала около 0,4 пмоль *grsA* мРНК и 3 мкг суммарной тРНК. После добавления 1 мкл раствора РНКазы смесь инкубировали при 37° С (количества ферментов и время инкубации указаны в подписях к рис. 3, 4). Реакцию останавливали добавлением 20 мкл стоп-раствора (0,4 М ацетат Na (рН 5,2), 20 мМ Na₂EDTA, 4 мкг тРНК), проводили фенольную экстракцию и РНК осаждали этанолом. Осадки растворяли в 3 мкл буфера для отжига, содержащего 0,6 пмоль меченого праймера и 3 ед. акт. ингибитора РНКаз. Условия отжига и обратной транскрипции те же, что и для реакций секвенирования.

Авторы выражают искреннюю благодарность д-ру И. Шниру (J. Schnier, University of California, Davis, USA) за предоставление плазмид, содержащих ген белка S1, В. И. Махно (ЛИЯФ РАН, Гатчина) — за препараты 30S субчастиц рибосом *E. coli*, И. П. Чернову (ФИБХ РАН) — за синтез олигонуклеотидного праймера. Работа частично финансировалась по программе ГНТП (проблема «Внеклеточный синтез белка»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bachmann B. // Microbiol. Rev. 1983. V. 47. P. 180—230.
2. Christiansen L., Pedersen S. // Mol. Gen. Genet. 1981. V. 181. № 3. P. 548—551.
3. Nomura M., Gourse R., Baughman G. // Ann. Rev. Biochem. 1984. V. 53. P. 75—118.
4. Boni I. V., Zlatkin I. V., Budowsky E. I. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 121. № 2. P. 371—376.
5. Suryanarayana T., Subramanian A. R. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 6. P. 1047—1051.
6. Van Diejen G., Van Knippenberg P. H., Van Duin J. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 64. № 3. P. 511—518.
7. Subramanian A. R. // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1983. V. 28. P. 101—142.
8. Boni I. V., Isaeva D. M., Musychenko M. L., Tzareva N. V. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 1. P. 155—162.
9. Skouv J., Schnier J., Rasmussen M. D., Subramanian A. R., Pedersen S. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 28. P. 17044—17049.
10. Schnier J., Isono K. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 6. P. 1857—1865.
11. Pedersen S., Skouv J., Kajitani M., Ishihama A. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 196. № 1. P. 135—140.
12. Schnier J., Stoffler G., Nishi K. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 25. P. 11866—11871.
13. Promega. 1990/91 Catalogue. P. 64.
14. Hartz D., McPheeters D. S., Traut R., Gold L. // Meth. Enzymol. 1988. V. 164. P. 419—425.
15. Inoue T., Cech T. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 3. P. 648—652.
16. Pleij C. W. A. // Trends Biochem. Sci. 1990. V. 15. № 4. P. 143—147.
17. de Smit M. H., Van Duin J. // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 1990. V. 38. P. 1—35.
18. Kirillov S. V., Machno V. I., Semenov Yu. P. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 1. P. 183—196.

Поступила в редакцию
9.IV.1993

N. V. Tzareva, M. L. Musychenko, I. V. Boni

SECONDARY STRUCTURE ANALYSIS OF THE REGULATORY REGION
OF THE *Escherichia coli* *rpsA* mRNA

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow

The *rpsA* gene of *E. coli* coding for the ribosomal protein S1 was inserted into the plasmid pGEM-3Z under the control of a T7 promoter. The resulted plasmid was used for mRNA preparation *in vitro*. The toeprint analysis of the *rpsA* mRNA revealed a strong S1 dependence: 30S ribosomal subunits lacking S1 were inactive in the 30S initiation complex formation; addition of the free S1 restored subunits' ability to bind mRNA; a molar excess of the free S1 over ribosomes was inhibitory. The secondary structure of the *rpsA* mRNA in the vicinity of the initiation codon was probed with the use of specific ribonucleases. Basing on the experimental data obtained we suggest a model for the structural organisation of the *rpsA* mRNA translation initiation region.