



УДК 577.217.525

ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА В *E. coli* ОТ СТРУКТУРЫ УЧАСТКА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ (TIR) III*. САЙТЫ КОМПЛЕМЕНТАРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ TIR С 16S рРНК

© 1997 г. А. И. Гуревич[#], Р. С. Есипов, Т. А. Качалина, А. Л. Каюшин, М. Д. КоростелеваИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 24.02.97 г. Принята к печати 07.07.97 г.

Выявлены сайты вероятного комплементарного взаимодействия участка инициации трансляции (TIR) с 16S рРНК. Изучено значение этих сайтов для уровня экспрессии генов. Высокий уровень экспрессии гена зависит не только от комплементарного взаимодействия TIR с 16S рРНК в сайтах, проксимальных к иницирующему кодону (с ASD ($\Delta G > -8 \dots -10$ ккал/моль) и с DB) и расположенных в области $-15 \dots +20$ мРНК, но и от комплементарных взаимодействий в дистальных сайтах нетранслируемой ветви TIR (mTIR). Среди них сайт UB1, комплементарно взаимодействующий с экспонированным участком 452–490 петли 440–490 16S рРНК, может располагаться в области mTIR $-15 \dots -50$. В области mTIR $-50 \dots -70$ могут располагаться сайты UB2 и UB3, взаимодействующие соответственно с экспонированными участками 478–488 петли 440–490 16S рРНК и 520–532 петли 520–540 16S рРНК, причем сайт UB3 значительно эффективнее. Для достижения высокого уровня экспрессии суммарная свободная энергия комплементарного взаимодействия сайтов UB1, UB2 и UB3 с 16S рРНК должна быть выше -20 ккал/моль.

Ключевые слова: мРНК, рРНК, инициаторный комплекс, участок инициации трансляции, экспрессия генов.

В предыдущих сообщениях [1, 2] мы показали, что в структуре участка инициации трансляции (TIR) прокариотов помимо известных ранее сайтов (SD, UB1, DB) имеется дополнительный сайт (UB2), взаимодействующий, вероятно, с петлей 440–490 16S РНК рибосомы *E. coli*. Полученные нами данные свидетельствовали, что уровень экспрессии тестированных генов и, следовательно, эффективность инициации трансляции зависят от энергии взаимодействия мРНК с 16S РНК во всех указанных сайтах. Это взаимодействие в свою очередь связано с вторичной структурой мРНК, возникающей не только в пределах TIR, но и с участком удаленных от TIR участков мРНК. С целью уточнения и детализации сделанных нами ранее выводов мы продолжили исследование зависимости между структурой мРНК и уровнем экспрессии гена интерлейкина-3 (hIL3).

Сокращения: IPTG – изопропил- β -D-тиогаляктозид; TIR, mTIR и MTIR – участок инициации трансляции, его нетранслируемая и транслируемая ветви; SD – последовательность Шайна–Дальгарно; ASD – anti-SD, 3'-концевая последовательность 16S рРНК; UB (upstream box) – часть mTIR, комплементарная участку AUB (anti-upstream box) в 16S рРНК; DB (downstream box) – часть MTIR, комплементарная участку ADB (anti-downstream box) в 16S рРНК.

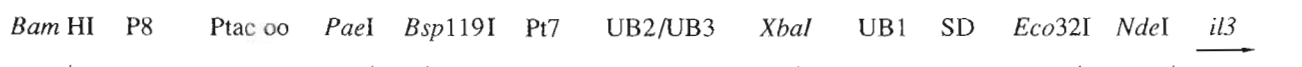
* Предыдущие сообщения см. [1, 2].

[#] Автор для переписки.

Мерой уровня экспрессии в наших экспериментах служило содержание (%) hIL3 в тотальном лизате клеток продуцента. Из полученных нами данных (см. ниже) следует, что наибольшее влияние на уровень экспрессии оказывает связывание mTIR с сайтом ASD, минимально необходимая свободная энергия которого должна быть не ниже -6.5 ккал/моль. Однако наличия в mTIR структуры SD недостаточно для достижения высокого уровня экспрессии гена *il3* (например, в случае плазмиды rFPCP10il3 [3]). Существенно повышает уровень экспрессии присутствие в TIR дополнительных сайтов связывания с рибосомой (UB1 [4] и DB [5]). Эти дополнительные сайты способны в некоторых случаях заменять структуру SD при инициации трансляции [6, 7].

Чтобы уточнить предположение об участках связывания мРНК с 16S РНК в инициаторном комплексе, а также о возможной роли суммарной энергии такого связывания, мы сконструировали новую серию экспрессионных плазмид с уже использованным ранее геном *il3* [1–3]. В эту новую серию плазмид мы включили также видоизмененную конструкцию (prpTE2il3; на рис. 1 и в таблице обозначена как (62)) исходной экспрессионной плазмиды рЗrTE2il3 (прежде названной рТОТЕ2IL3 [2]; на рис. 1 и в таблице – (61)), в

(61)



(62)

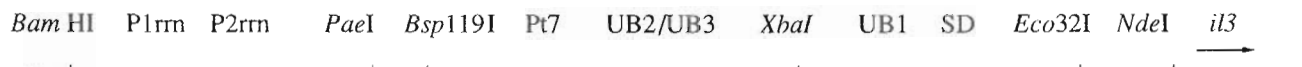


Рис. 1. Схемы строения регуляторных участков гена *il3* в плаزمидах р3рТЕ2и13 (61) и ргрТЕ2и13 (62). Указаны положения промоторов (P), *lac*-операторов (o), сайтов связывания соответствующих мРНК с 16S рРНК (UB2/UB3, UB1, SD) и сайтов рестриктаз.

которой вместо промоторов P8 и P_{tac} с последующими двумя *lac*-операторами был введен тандем двух конститутивных промоторов P1 и P2 гена *rrnB* [8]. Использование в качестве штамма-хозяина *E. coli* XL1 для экспрессионных плазмид позволяет изучать в сравнимых условиях биосинтез белка при транскрипции, инициированной как с конститутивных (конструкции типа ргрТЕ2и13), так и с

индуцируемых промоторов (конструкция типа р3рТЕ2и13). В штамме-хозяине *E. coli* BL21(DE3) в обоих типах экспрессионных плазмид осуществляется индуцируемая IPTG транскрипция с участием дополнительного промотора Pt7. Наличие тандема нескольких промоторов приводит к использованию в трансляции мРНК с различными 5'-концевыми нетранслируемыми участками, что, по нашим

Биосинтез hIL3 на мРНК, инициированных с промоторов гена *rrnB*, P_{tac} и Pt7

Экспрессионная плазмид	Структура регуляторных участков*	Содержание hIL3 (%) в тотальном лизате штамма-производителя	
		клетки <i>E. coli</i> XL1	клетки <i>E. coli</i> BL21(DE3)
(а)	ргрТЕ7и13	10	10
(б1)	р3рТЕ2и13	>25	>25**
(б2)	ргрТЕ2и13	>25	>25
(в)	р3рТЕ8и13	10	10
(г1)	р3рТЕ9и13	20	20
(г2)	ргрТЕ9и13	–	20
(д)	р3рТЕ10и13	12	–
(е)	р3рТЕ11и13	10	–
(ж)	р3рТЕ12и13	>25	>25
(з)	р3рТЕ13и13	15	–
(и)	р3рТЕ14и13	5	–
(к)	ргрТЕ15и13	15	–
(л)	ргрТЕ16и13	<1	<1
(м)	р3рТЕ17и13	10	7
(н)	р3рТЕ18и13	10	10
(о1)	р3рТЕ19и13	<5	–
(о2)	ргрТЕ19и13	<5	–
(п)	р3рТЕ20и13	<5	10

* Сокращенные условные обозначения регуляторных участков: r – промоторы P1 и P2 гена *rrnB*, 8 – промотор P8 фага fd, t – промотор P_{tac}, 7 – промотор гена 10 фага T7; 1 – UB1, 2 – UB2, 3 – UB3, s – SD; n – natural, i – ideal, m – minimal, a – anti. Развернутое пояснение к этим условным обозначениям изложено при обсуждении результатов в тексте.

** В работе [2] ошибочно приведена заниженная величина 3.2%.

	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUGGCGCCGACGA	...	CCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(a)	... CUUCGAA	-AUUAAUACGACUCAC	...	CUUCGAAAUUAAUACGACUCAC		(-45)	...		
		-7.0	-2		-6.0				
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUGG---CGCCGACGA	...	CCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(б), (к), (л)	... UAGGGAG	-ACCACAACGGUUUCCC	..	UAGGGAGACCACAACGGUUU	---CCC	(-43)	...		
		-3.3	-7.0	-7.8	-6.7	-1.7	-5.7	-3	-7.7
									AAAUGAGGG
									461 AUB2 452
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUG-GCGCCGA--CGA	...	GCCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(в), (о)	... GGC	GGGUAA-CGUCAAUGAGCAAAG	..	CGGGUAAACGUCAAUGAGCAAAG		(-44)	...		
		-3.4	-3.4	-3.4		-45.4			
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGGAGGC	--UAAUGGCGCCGACGA	...	CCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(г)	... GGGCCCAUUGCAGUUAGU	-CGUUUC	...	GGGCCCAUUGCAGUUACUCGUUU		(-44)	...		
		-7.7	-7.0	-3.4		0			
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUGGCGCCGACGA	...	CCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(д), (п)	... GUUUUGUAACGUC	AAUUUCUUUU	..	GUUUUGUAACGUC	AAUUUCUUUU	(-42)	...		
		0				-12.7			
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUGGCGCCGACGA	...	CCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(е)	... AAAGAAA	UUGACGUUACAAAA	..	AAAGAAA	UUGCAGUUACAAAA	(-42)	...		
		-4.0	-3.4			-3.6			
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUGGCGCCGACGA	...	GCCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(ж), (м), (н)	... CUCCGAUU	ACCGCGGCGUCU	...	CUCCGAUU	ACCG--CGGCUGCU	(-49)	...		
		-44.2			-3.4	-3.4	-3.4		
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUGGCGCCGACGA	...	CCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(з)	... CUAGUUA	ACCGAUUACCGAUUUC	..	CUAGUUA	ACCGAUUACCGAUUUC	(-46)	...		
		-18.4				-4.6			
	540	AUB3	520	490	AUB2	470			
16S PHK	... GGAGGC	AAUGGCGCCGACGA	...	CCCAUUGCAGUU	ACUCGUUU	...			
(и)	... GAAAU	CGGUAAUCGGU	..	GAAAU	CGGUAAUCGGU	(-50)	...		
			-7.0			-7.9			

Рис. 2. Структуры TIR и их взаимодействие с участками AUB2 и AUB3 16S рРНК (в конструкции (а) над цепью 16S рРНК указаны номера нуклеотидов ее последовательности; экспонированные части петель рРНК выделены жирным шрифтом). Для каждой последовательности справа в скобках указано положение последнего нуклеотида в приведенном участке мРНК относительно иницирующего кодона. Точками отмечены комплементарно взаимодействующие нуклеотиды и под последовательностью приведены величины свободных энергий такого взаимодействия (ΔG , ккал/моль). Данные приведены для мРНК, кодируемых плазмидами (а)–(п), обозначения и структура регуляторных участков которых даны в таблице.

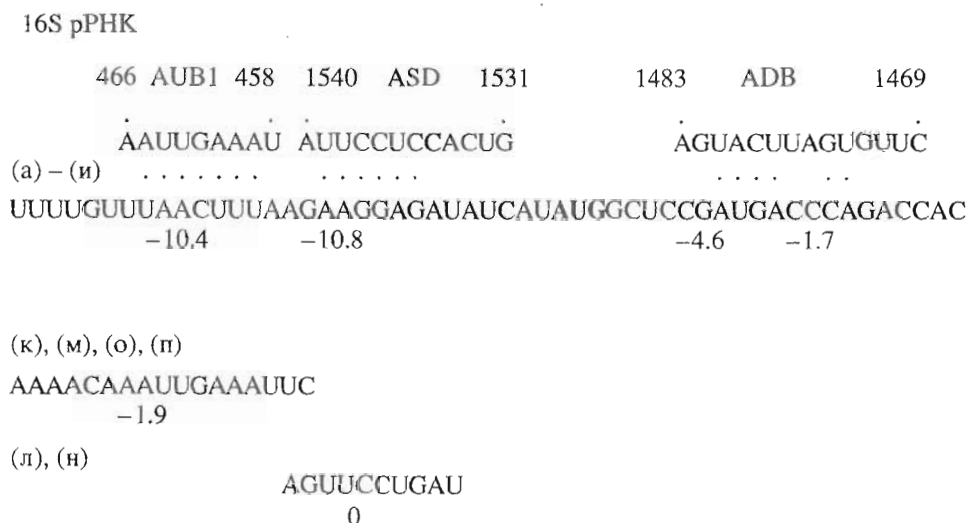


Рис. 3. Структуры TIR (участок мPHK от -30 до +20, иницирующий кодон выделен жирным шрифтом) и их взаимодействие с участками AUB1, ASD и DB (указаны номера нуклеотидов в последовательности 16S рPHK). Точками отмечены комплементарно взаимодействующие нуклеотиды и под последовательностью приведены величины свободных энергий такого взаимодействия (ΔG , ккал/моль). Приведены данные для мPHK, кодируемых плазмидами (а)–(п), обозначения и структура регуляторных участков которых дана в таблице.

наблюдениям [2], способствует достижению высокого уровня экспрессии. Следует отметить, что сила промоторов в изученных нами структурах не играет первостепенной роли для уровня экспрессии гена *iI3* (ср., например, данные в таблице для конструкций (б1) и (б2), (г1) и (г2), (о1) и (о2)) и уровень экспрессии определяется главным образом эффективностью процесса трансляции.

В исходных плазмидах (б1) и (б2) содержится нуклеотидная последовательность изученной ранее [1, 4] лидерной части мPHK гена 10 фага T7, которую в настоящей работе мы называем природной (natural) и обозначаем соответствующий ей участок UB2/UB3 как nUB2. При конструировании новых плазмид мы заменяли в исходных плазмидах (б1) или (б2) (см. рис. 1) участки, содержащие структуры UB2/UB3 между сайтами рестриктаз *Bsp1191* или *PaeI* и *XbaI* либо UB1 и SD между сайтами *XbaI* и *Eco32I*, на синтетические олигонуклеотидные дуплексы, соответствующие фрагментам мPHK, которые в различной степени комплементарны участкам 16S рPHK, расположенным в сайте инициации трансляции на 30S-субъединице рибосомы. В этот сайт наряду со структурами ASD и ADB входит петля 440–490, включающая экспонированные части AUB1 (457–469) и AUB2 (470–490), а также петля 520–540 [9, 10] (структура AUB3).

Структуры участков мPHK, транскрибируемых с вновь полученных плазмид, приведены на рис. 2 и 3. Частичная структура каждой из мPHK на рис. 2 изображена дважды для наглядного представления о возможных комплементарных взаимодействиях как с AUB2, так и с AUB3.

Структура (в) полностью комплементарна участку AUB2, а структуры (ж), (м), (н) – участку AUB3 (идеальные (ideal) сайты UB2 и UB3, обозначенные iUB2 и iUB3). Структура (г) представляет собой инвертированную последовательность iUB2 (anti-, aiUB2). В структуре (д) комплементарность участку AUB2 ограничена экспонированной областью 478–488 (minimal-, mUB2), а структура (е) включает инвертированную последовательность mUB2 (amUB2). В структуре (з) комплементарность участку AUB3 ограничена экспонированной областью 520–534 (mUB3), а структура (и) включает инвертированную последовательность mUB3 (amUB3). Наконец, в структурах (к) и (л) сохраняется последовательность участка UB2/UB3 плазмиды (б) (nUB2), но в плазмиде (к) вместо участка UB1 содержится инвертированная последовательность aUB1, а в плазмиде (л) вместо участка SD содержится инвертированная последовательность aSD. Кроме того, в плазмиде (а) делегирована область UB2/UB3 между промотором Pt7 и областью UB1, в результате транскрипт с вышерасположенных промоторов может использовать структуру промотора Pt7 в качестве измененного сайта UB2/UB3.

Выбор исследуемых структур делался последовательно, по результатам предыдущих опытов. Сначала мы основывались на предположении о комплементарном взаимодействии с участком AUB2 “природной” структуры nUB2 в дистальной части мTIR гена 10 фага T7, а также других эффективно транслируемых генов [1]. Однако в прежде рассмотренных случаях возможное взаимодействие UB2 : AUB2 было далеко от полностью комплементарного. Поэтому

мы заменили структуру UB2 на iUB2. Неожиданно уровень экспрессии гена *il3* в соответствующей плазмиде (в) оказался существенно ниже, чем в исходной плазмиде (б1) со структурой pUB2. Для объяснения этого факта мы даже предположили, что iUB2 связывается с AUB2 слишком прочно (значение ΔG такого связывания должно составлять -45 ккал/моль, см. рис. 2) и это препятствует перемещению мРНК для следующей ступени связывания в инициаторном комплексе. В то же время оказалось, что при замене структуры iUB2 на инвертированную последовательность aiUB2 уровень экспрессии в плаزمиде (г1) и (г2) остается практически столь же высоким, как в исходных плазмиде (б1) и (б2), хотя комплементарное связывание мРНК с участком AUB2 невозможно. Поэтому мы предположили, что связывание мРНК происходит с участком AUB3, возможность комплементарного взаимодействия с которым мы ранее не рассматривали. Это предположение подтвердил наивысший среди изученных структур уровень экспрессии ($>25\%$) в плазмиде (ж), в которой структура aiUB2 была заменена на iUB3, полностью комплементарную участку AUB3. Чтобы выяснить, имеет ли значение комплементарность мРНК участкам AUB2 и AUB3 целиком или важно лишь взаимодействие с экспонированными частями соответствующих петель 16S рРНК, мы получили структуры (д) (в которой связывание возможно только с экспонированной частью AUB2, но не с AUB3) и (з) (в которой связывание с экспонированной частью AUB3 должно быть достаточно прочным при практическом отсутствии связывания (е) и (и) (см. рис. 2). Во всех случаях для этих структур плазмид наблюдался относительно высокий уровень экспрессии (10–15%), хотя он был значительно ниже максимально достигнутого.

Чтобы выяснить истинное значение использованных структур в mTIR для связывания в инициаторном комплексе, мы сопоставили уровни экспрессии гена *il3* в плазмиде (а)–(п) (см. таблицу) с рассчитанной теоретически энергией комплементарных взаимодействий соответствующих мРНК и сайтов связывания TIR на 16S рРНК (см. рис. 2 и 3).

В мРНК гена *il3* вклад участка DB в общее взаимодействие TIR с рибосомой несуществен (см. рис. 3), хотя, возможно, дополняет прочное связывание структур UB1 и SD, приводящее к достаточно высокому уровню экспрессии гена в плазмиде (а) (см. таблицу). Связывание с участками UB1, SD и DB в области $-25 \dots +20$ мРНК, очевидно, фиксирует мРНК так, что иницирующий кодон располагается против антикодона тРНК^{fmet}, в свою очередь связывающейся при этом с участком $-4 \dots +11$ [10, 11] за счет взаимодействия не только в антикодонной петле, но и, возможно, с боковыми петлями структуры клеверного листа (ср. данные работ [12, 13]).

Что касается влияния структуры мРНК в дистальной области mTIR ($-25 \dots -70$), то одной из причин могло быть образование вторичной структуры, в которой проксимальная область $-25 \dots +20$ более доступна для взаимодействия с рибосомой. Оценивая с этой точки зрения использованные нами структуры, мы нашли, что в проанализированных последовательностях не имеется выраженных структур с энергией более -8 ккал/моль. Очевидно, что влияние таких структур не может быть существенным.

Отсюда следует, что наиболее вероятным фактором, повышающим уровень экспрессии гена, является комплементарное взаимодействие экспонированных на поверхности рибосомы петель 16S рРНК с дополнительными сайтами в области $-25 \dots -70$ мРНК. Это предположение подтверждает сопоставление данных, приведенных на рис. 2, 3 и в таблице.

Действительно, минимальная экспрессия гена *il3* ($<1\%$) наблюдается в плазмиде (л), в которой связывание в сайтах UB1 и UB2/UB3 не может компенсировать отсутствие взаимодействия со структурой ASD. Немного больший уровень экспрессии ($<5\%$) наблюдается в ранее изученной плазмиде pTE1il3, в которой отсутствует участок UB2/UB3 [3], и в плазмиде (и), (о) и (п), где взаимодействие с участком AUB3 отсутствует, а с участком AUB2 – недостаточно или практически не реализуется либо слабые взаимодействия с участками AUB2 и AUB3 не могут складываться и конкурируют за связывание с одной и той же последовательностью mTIR. Уровень экспрессии возрастает (до 10–12%) при переходе к плазмиде (а), (в), (д) и (е), в которых связывание мРНК с участком AUB2 (плазмиды (в) и (д)) либо AUB3 (плазида (е)) является удовлетворительным или может складываться со связыванием в участке AUB3, поскольку такое взаимодействие приходится на разные районы последовательности mTIR (плазида (а)).

Дальнейшее возрастание уровня экспрессии (до 15%) происходит в плазмиде (з) и (к), в которых взаимодействие мРНК с AUB3 сильнее взаимодействия с AUB2. Однако если в структуре (з) имеется сайт сильного связывания с AUB1 в области $-15 \dots -25$ мРНК, то в (к) такое связывание в этой области отсутствует (рис. 3). В то же время достаточно сильное взаимодействие структуры (к) с петлей 16S рРНК, включающей сайт AUB1, возможно в области $-42 \dots -50$ (см. рис. 2), что, вероятно, компенсирует недостающее связывание.

Наивысший уровень экспрессии гена *il3* (20% и более) наблюдается в плазмиде (б), (г) и (ж), в mTIR которых наряду с сильным взаимодействием со структурами ASD и AUB1 возможно сильное взаимодействие со структурой AUB3. Если энергия такого взаимодействия становится доста-

точно большой, она может компенсировать недостаточное связывание в участке AUB1 и даже ASD. В результате этого в плаزمиде (к) и (м) уровень экспрессии сохраняется на уровне 10–15%, а при переходе от плазмиды (л) к (н) возрастает с <1 до 10%, хотя в плазмиде (о) и (п) он остается низким (<5%). Последнее, очевидно, свидетельствует о том, что комплементарное взаимодействие мРНК со структурой AUB2 значительно слабее, чем со структурой AUB3, если оно вообще реально осуществляется.

У всех изученных в настоящей работе структур mTIR сайты возможного комплементарного взаимодействия с участками AUB2 и AUB3 располагаются в районе –50 ... –70 мРНК. В то же время комплементарная AUB1 структура имеется почти всегда в районе –15 ... –25 и лишь в плазмиде (к) возможный сайт UB1 располагается в районе –40 ... –50, однако в ранее рассмотренных структурах pTE3i13, pTEd13 и pTEe13 [1] он также расположен дальше от иницирующего кодона – в районе –30 ... –45 мРНК.

Таким образом, высокий уровень экспрессии гена зависит не только от комплементарного взаимодействия TIR с 16S рРНК в сайтах, проксимальных к иницирующему кодону (с ASD ($\Delta G > -8 \dots -10$ ккал/моль) и с DB) и расположенных в области –15 ... +20 мРНК, но и от комплементарных взаимодействий в дистальных сайтах mTIR. Среди них сайт UB1, комплементарно взаимодействующий с экспонированным участком 452–490 петли 440–490 16S рРНК, может располагаться в области mTIR –15 ... –50. В области mTIR –50 ... –70 могут располагаться сайты UB2 и UB3, взаимодействующие соответственно с экспонированными участками 478–488 петли 440–490 16S рРНК и 520–534 петли 520–540 16S рРНК; сайт UB3 при этом значительно эффективнее. Высокий уровень экспрессии достигается, если суммарная свободная энергия комплементарного взаимодействия сайтов UB1, UB2 и UB3 с 16S рРНК превышает –20 ккал/моль, как это следует из сопоставления данных, приведенных на рис. 2 и 3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трис, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal); агарозу, АТФ, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевины, ос. ч. ("Реахим"); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); [γ - 32 P]АТФ, [α - 32 P]dАТФ (200 Ки/ммоль, Обнинск); T4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), Taq-ДНК-полимеразу и модифицированную T7-ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7); рестрикционные эндонуклеазы (КФ 32.1.23.x) BglII,

BglIII, Bsp119I, EcoRI, Eco32I, PaeI, PstI, XbaI (Fermentas, Вильнюс).

Защищенные олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102U (БИОСАН, Новосибирск) и после деблокирования выделяли, как описано в работе [14].

Условия экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, трансформации компетентных клеток, клонированию, а также геле-электрофорезу и выделению ДНК из гелей приведены в работе [15].

Штаммы *E. coli*, содержащие экспрессионные плазмиды, выращивали в питательной среде УТ при 37°C до оптической плотности культуры $A_{595} = 0.5$, затем индуцировали IPTG и выращивали в течение еще 6 ч.

Для анализа белков 1 мл бактериальной культуры центрифугировали, растворяли в лизирующем буфере [16], нагревали 5 мин при 100°C и белки разделяли в 15% ПААГ в присутствии 0.1% SDS [16]. Гели прокрашивали кумасси R-250 и сканировали на сканере Microtek; интегрирование пиков проводили по программе SigmaGel (Jandel). Если содержание целевого белка составляет более 25% суммарного белка, то точное определение его количества лежит за пределами возможностей используемого сканера.

Для расчета свободных энергий комплементарных взаимодействий использовали пакет программ "Genebee" (Л.И. Бродский, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ).

Использованы штаммы *E. coli*: XL1-Blue [*recA1*, *lac*⁻, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsd R17*, *sup E44*, *rel A1* (F' *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15, Tn10)]; BL21(DE3) [F⁻, *hsdSgal*, *ompT*, *r*_B⁻, *m*_B⁻].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич А.И., Есинов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 117–123.
2. Гуревич А.И., Есинов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 282–288.
3. Гуревич А.И., Скапцова Н.В., Луценко С.В., Смирнов В.А., Куркин А.Н., Ажаев А.В. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. С. 647–652.
4. Olins P.O., Rangvala S.H. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 16 973–16 976.
5. Sprengart M.L., Fatscher H.P., Fuchs E. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 1719–1723.
6. Lochel S., Inamine J.M., Hu P.-Ch. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 6905–6911.
7. Resch A., Tedin K., Grundling A., Mundlin A., Blasi U. // EMBO J. 1996. V. 15. P. 4740–4748.
8. Гуревич А.И., Аваков А.Э., Игошин А.В., Колосов М.Н. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. С. 557–560.

9. Rinke-Appel J., Junke N., Brimacombe R., Lavrik I., Dokudovskaya S., Dontsova O., Bogdanov A. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 3018–3025.
10. Mulhotra A., Harvey S.C. // J. Mol. Biol. 1994. V. 240. P. 308–340.
11. McCarthy J.E.G., Brimacombe R. // Trends Genet. 1994. V. 10. P. 402–407.
12. Curry K.A., Tomich C.-S.C. // DNA. 1988. V. 7. P. 173–179.
13. Dahlberg A.E. // Cell. 1989. V. 57. P. 525–529.
14. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 629–632.
15. Гуревич А.И., Некрасова О.В. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. С. 149–152.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Relation between the Expression Level of an *Escherichia coli* Gene and the Structure of the Transcription Initiation Region (TIR). III. Sites of Complementary Interaction of TIR with 16S rRNA

A. I. Gurevich, R. S. Esipov, T. A. Kachalina, A. L. Kayushin, and M. D. Korosteleva

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Abstract—Potential sites of the complementary interaction of the translation initiation region (TIR) with 16S rRNA are revealed, and the role of these sites in the gene expression level is studied. The high expression level of a gene depends not only on the complementary interaction of TIR with 16S rRNA in sites proximal to the start codon [anti-Shine–Dalgarno (ASD) ($\Delta G > -8$ to -10 kcal/mol) and downstream box (DB)] and located at the -15 to $+20$ mRNA region but also on complementary interactions in distal sites of the untranslated branch of TIR (mTIR). Among them, the UB (upstream box) 1 site, complementarily interacting with the exposed 452–490 segment of the 440–490 loop of 16S rRNA, may be located in the -15 to -50 mTIR segment. In the -50 to -70 mTIR segment may be located UB2 and UB3 sites, which interact with the exposed segment 478–488 of the 440–490 loop and segment 520–532 of the 520–540 loop of 16S rRNA, the UB3 site being much more efficacious. The high expression level requires that the total free energy of complementary interactions of UB1, UB2, and UB3 sites with 16S rRNA exceeds -20 kcal/mol.

Key words: mRNA, rRNA, initiation complex, translation initiation region, gene expression