



УДК 577.217.525

ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА В *E. coli* ОТ СТРУКТУРЫ УЧАСТКА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ (TIR). IV*. ДАЛЬНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ TIR С КОДИРУЮЩЕЙ ЧАСТЬЮ мРНК

© 1999 г. Р. С. Есипов[#], А. И. Гуревич, А. Л. Каюшин, М. Д. Коростелева, М. А. Белова*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Московский физико-технический институт, 141700, Долгопрудный Московской обл.

Поступила в редакцию 18.09.98 г. Принята к печати 22.03.99 г.

С целью выяснения влияния на процесс трансляции удаленных участков кодирующей части мРНК, способных комплементарно связываться с участком RBS, сконструирована серия плазмид со вставленными в ген *il3* фрагментами, направленно определяющими вторичные взаимодействия в мРНК. При сравнении уровней экспрессии генов *in vivo* показано, что комплементарные взаимодействия участка инициации трансляции (TIR) с удаленными участками кодирующей части мРНК непосредственно влияют на процесс трансляции. При этом эффективность взаимодействий уменьшается с увеличением расстояния между участком связывания рибосомы (RBS) и комплементарной ему областью мРНК, а вторичная структура, образованная TIR и близко расположенным участком мРНК, оказывается более стабильной, несмотря на наличие в мРНК участков, способных образовывать энергетически более выгодные структуры с этими элементами.

Ключевые слова: мРНК; участок инициации трансляции; вторичная структура РНК.

В предыдущих сообщениях [1–3] мы проанализировали влияние первичной структуры мРНК в районе TIR на уровень экспрессии генов и показали, что фактором, определяющим эффективность инициации трансляции и высокий уровень экспрессии являются, в первую очередь, комплементарные взаимодействия TIR с 16S рРНК в инициаторном комплексе. Сайты такого комплементарного взаимодействия включают участки UB и SD, расположенные в нетранслируемой ветви mTIR. Поскольку указанные сайты в TIR могут участвовать в комплементарных взаимодействиях не только с 16S рРНК, но также с дистальными участками мРНК в транслируемой области, общая вторичная структура мРНК может оказывать существенное влияние на эффективность инициации трансляции. Поэтому мы продолжили наше исследование и изучили влияние удаленных участков кодирующей части мРНК, способных комплементарно связываться с участком RBS,

включающим в себя последовательность SD и UB, на уровень белкового синтеза.

Для этой цели была сконструирована серия плазмид (*a*)–(*u*) со вставленными в ген человеческого интерлейкина-3 (*il3*) участками, направленно определяющими образование комплементарных дуплексов в мРНК. В качестве исходных плазмид были использованы полученные ранее плазмиды pte2il3 (ген *il3*) и pte2il3gh11 (ген *il3a*); плазида pte2il3gh11 отличается от pte2il3 только отсутствием стоп-кодона в конце гена *il3* и наличием полилинкерной последовательности [4]. Частичная схема строения этих плазмид приведена на рис. 1.

Для конструирования плазмид (*a*)–(*u*) использовали вставки дуплексов синтетических олигодезоксирибонуклеотидов, структура которых приведена на рис. 2. На этом же рисунке указаны сайты соответствующих эндонуклеаз рестрикции, по которым встраивались эти дуплексы, а также названия полученных генов в рекомбинантных плаزمидлах.

В результате, на основе плазмиды pte2il3, были получены рекомбинантные плазмиды (*a*)–(*z*), (*ж1*) и (*з1*), содержащие вставки (или замены) нуклеотидных последовательностей между сайтами *HpaI*–*HindIII* (гены *ilhhs*, *ilhhr* и *ilhhs1*), *HindIII* (ген *ilhs*) и *EcoRI* (ген *il3*). Плазмиды (*d*, *e*, *ж2* и *з2*), содержащие вставки (или замены) нуклеотидных

* Предыдущие сообщения см. [1–3].

Сокращения: 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, расположенная перед последовательностью SD; RBS – участок связывания рибосомы.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-72-47; e-mail: esipov@ibch.siobc.ras.ru).

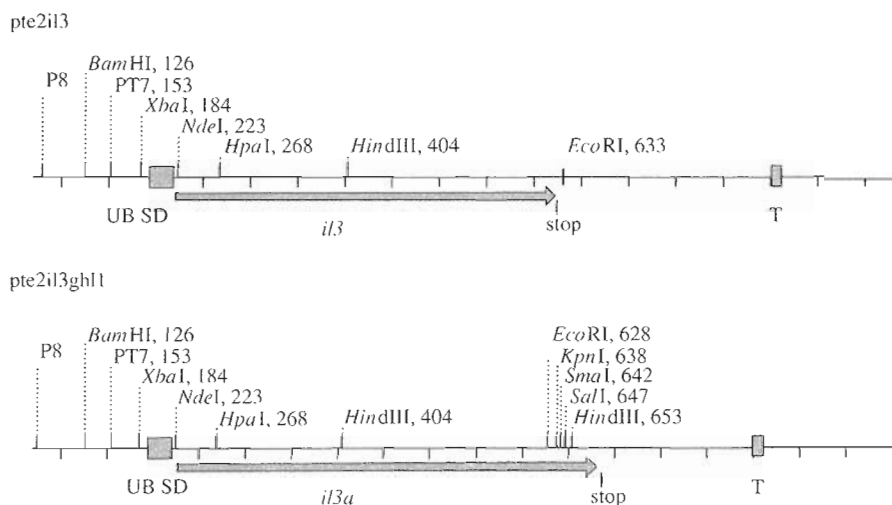


Рис. 1. Схема строения фрагментов плазмид pte2il3 и pte2il3ghl1. Указаны сайты рестриктаз, положение промоторов (PT7) и (P8), участков UB и SD, терминатора (T) транскрипции, гена интерлейкина-3 (*il3* или *il3a*) и его стоп-кодона (stop).

последовательностей между сайтами *EcoRI*–*SalI* (гены *iless* и *ilesr*) или же *EcoRI* (гены *ilepr* и *ileps2*) получены на основе плазмиды pte2il3ghl1. В сконструированных таким образом генах вставки расположены на расстоянии соответственно 48 (сайт *HpaI*), 184 (сайт *HindIII*) или 408 п.о. (сайт *EcoRI*) от иницирующего кодона.

Полученные плазмиды образуют три группы. В первой группе (плазмиды *a*, *в*, *г*, *д*, *з2*) при транскрипции генов *ilhhs*, *ilhs*, *iless* образуются мРНК, содержащие участок размером 21 нт (структура *s*), комплементарный структуре в не-транслируемой ветви мТГР, включающей последовательности SD и UB; в случае генов *ilhhs1* и *ileps2* участки комплементарности (структуры *ps1* и *ps2*) существенно меньше (12 нт) (см. рис. 3).

Вторую, контрольную группу образуют исходные плазмиды с генами *il3* (плазмида pte2il3) и *il3a* (плазмида pte2il3ghl1), мРНК которых не содержат участков, способных комплементарно взаимодействовать с SD и UB. К этой группе относится также плазмида (*б*) с укороченным геном *il3* (отсутствует фрагмент гена между сайтами *HpaI* и *HindIII*), контрольная в отношении других плазмид с укороченным геном *il3* (плазмиды *a*, *в*, *u*).

В третью группу входят плазмиды (*б*), (*е*) и (*ж2*) с генами *ilhhr*, *ilesr* и *ilepr*, которые содержат трансвертированные последовательности вставок (по сравнению с плазмидами *a*, *д* и *з2*); в мРНК таких генов также не содержится комплементарных ТГР участков (см. структуры *r1*, *r2* и *rg* на рис. 3).

Следует отметить, что на уровень экспрессии могло оказывать влияние разное количество целевого транскрипта в клетках продуцентов с разными плазмидами. Однако, когда мы сравнили количество мРНК, вновь синтезированной после

индукции транскрипции, оказалось, что оно для разных продуцентов остается примерно одинаковым. Для цели сравнения суммарную РНК из одинаковых количеств клеток продуцентов выделили по методу [5] и содержание в образцах целевой мРНК оценивали по результатам дот-гибридизации [6] с ³²P-меченым олигонуклеотидом, комплементарным участку мРНК в 3'-концевой части (данные не приводятся). Таким образом, изменение в уровне экспрессии соответствующих генов зависит главным образом от эффективности процесса трансляции.

Индукцированный биосинтез белков на мРНК, иницированных с промотора PT7

Экспрессионная плазмида	Ген	Белковый продукт, %
(<i>a</i>)	<i>ilhhs</i>	<1
(<i>б</i>)	<i>ilhhr</i>	>25
(<i>в</i>)	<i>ilhhs1</i>	<1
(<i>г</i>)	<i>ilhs</i>	5
(<i>д</i>)	<i>iless</i>	15
(<i>е</i>)	<i>ilesr</i>	~1
(<i>ж1</i>)	<i>il3</i>	25
(<i>ж2</i>)	<i>ilepr</i>	<1
(<i>з1</i>)	<i>il3</i>	25
(<i>з2</i>)	<i>ileps2</i>	25
(<i>u</i>)	<i>ilhsepr</i>	~1
pte2il3	<i>il3</i>	25
pte2il3ghl1	<i>il3a</i>	25

Приведено содержание белкового продукта в тотальном лизате штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3).

		Гены
(a)	<p style="text-align: center;"><i>HpaI</i> <i>HindIII</i></p> <p>...GTT AACTTCTCCTTCTTAAAGTTAAACGA AGCTT... ...CAA TTGAAGAGGAAGAATTTCAATTTGCTTCGA A...</p>	<i>ilhhs</i>
(б)	<p style="text-align: center;"><i>HpaI</i> <i>HindIII</i></p> <p>...GTT CCATTAGAGGAAGAATTTCAATTTGA AGCTT... ...CAA TTGAATCTCCTTCTTAAAGTTAAACTTCGA A...</p>	<i>ilhhr</i>
(в)	<p style="text-align: center;"><i>HpaI</i> <i>HindIII</i></p> <p>...GTT AACTTCTCCTTCTTACCCGA AGCTT... ...CAA TTGAAGAGGAAGAATGGGCTTCGA A...</p>	<i>ilhhs1</i>
(г)	<p style="text-align: center;"><i>HindIII</i> <i>HindIII</i></p> <p>...A AGCTTCTCCTTCTTAAAGTTAAACGCCCA AGCTT... ...TTCGA AAGAGGAAGAATTTCAATTTGCGGGTTCGA A...</p>	<i>ilh</i>
(д)	<p style="text-align: center;"><i>EcoRI</i> <i>SalI</i></p> <p>...G AATTCTATCTCCTTCTTAAAGTTAAACG TCGAC... ...CTTAA GATAGAGGAAGAATTTCAATTTGCAGCT G...</p>	<i>iless</i>
(е)	<p style="text-align: center;"><i>EcoRI</i> <i>SalI</i></p> <p>...G AATTCTTTAGAGGAAGAATTTCAATTTG TCGAC... ...CTTAA GAAATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAGCT G...</p>	<i>ilesr</i>
...	<p style="text-align: center;"><i>EcoRI</i> <i>EcoRI</i></p> <p>(ж1) ...TAATAG AATTCAGAAGGAGAAGTTAACCCAAGAGG AATTC... ...ATTATCTTAA GTCTTCCTCTTCAATTGGGTTCTCCTTAA G...</p>	<i>il3</i>
...	<p style="text-align: center;"><i>EcoRI</i> <i>EcoRI</i></p> <p>(ж2) ...CTTCCG AATTCAGAAGGAGAAGTTAACCCAAGAGG AATTC... ...GAAGGCTTAA GTCTTCCTCTTCAATTGGGTTCTCCTTAA G...</p>	<i>ilepr</i>
...	<p style="text-align: center;"><i>EcoRI</i> <i>EcoRI</i></p> <p>(з1) ...TAATAG AATTCCTCTTGGGTTAACTTCTCCTTCTG AATTC... ...ATTATCTTAA GGAGAACCCAATTGAAGAGGAAGACTTAA G...</p>	<i>il3</i>
...	<p style="text-align: center;"><i>EcoRI</i> <i>EcoRI</i></p> <p>(з2) ...CTTCCG AATTCCTCTTGGGTTAACTTCTCCTTCTG AATTC... ...GAAGGCTTAA GGAGAACCCAATTGAAGAGGAAGACTTAA G...</p>	<i>ileps2</i>
(и)	<p style="text-align: center;"><i>HpaI</i> <i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> <i>EcoRI</i></p> <p>...GTT.AACTTCTCCTTCTACCCGTA AGCTT...G AATTCAGAAGGAGAAGTTAACCCAAGAGG AATTC... ...CAA.TTGAAGAGGAAGATGGGCATTCGA A...CTTAA GTCTTCCTCTTCAATTGGGTTCTCCTTAA G...</p>	<i>ilhhspr</i>

Рис. 2. Схема конструирования рекомбинантных плазмид (а)–(и). Указаны сайты рестриктаз, по которым в гены *il3* или *il3a* встраивались синтетические олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы и обозначения полученных генов.

Мы полагаем, что в мРНК генов первой группы может возникать вторичная структура, включающая комплементарное взаимодействие не-транслируемой ветви mTIR и дистальных районов транслируемой части, что должно приводить к снижению эффективности инициации трансляции.

Следовательно, уровень экспрессии первой группы генов должен быть существенно ниже уровня экспрессии контрольной второй группы генов.

Действительно, из приведенных в таблице и на рис. 4 данных видно, что уровень экспрессии группы генов (плазмиды а, в, г, д) ниже, чем в

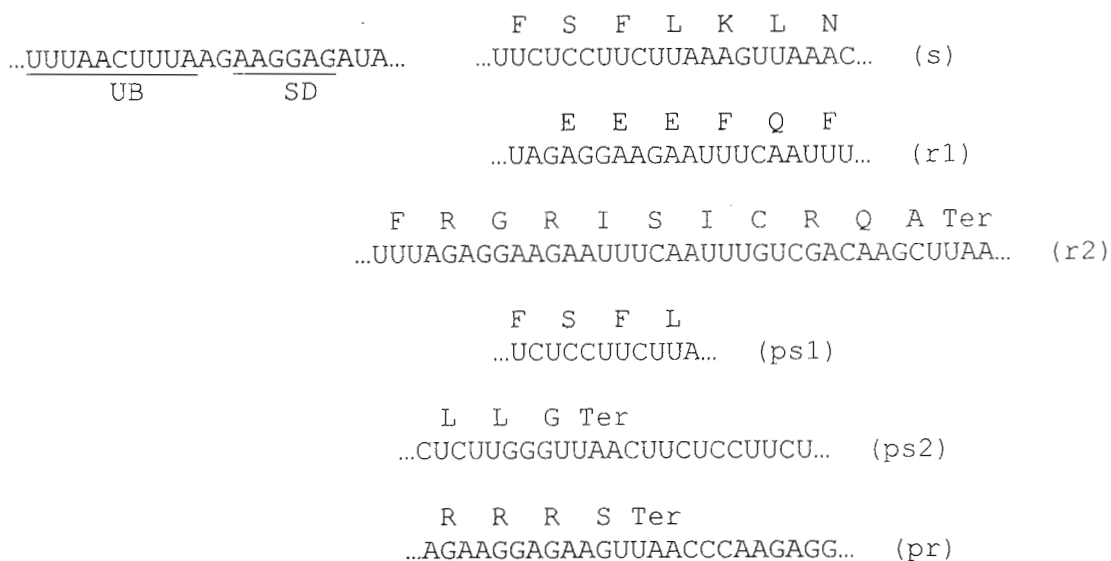


Рис. 3. Участки нуклеотидных последовательностей в мРНК, транскрибируемых с генов рекомбинантных плазмид (a)–(u). Обозначены участки UB и SD, а также структуры участков (s) (straight, прямая, комплементарная), (r1) и (r2) (reverse, обращенная, некомплемментарная), (ps1) и (ps2) (partial straight, частичная прямая, комплементарная), (pr) (partial reverse, частичная обращенная, некомплемментарная). Приведены аминокислотные последовательности, соответствующие участкам транслируемых мРНК.

контроле (плазмиды pte2il3, pte2ilgh11 и б), хотя абсолютные значения уровней экспрессии для разных генов в пределах одной группы сильно отличаются. В общем, наблюдается ослабление влияния на уровень экспрессии генов комплементарности участков в исследованных структурах мРНК при увеличении расстояния между ними. Возможно, это происходит вследствие того, что при трансляции мРНК с достаточно удаленными друг от друга комплементарными участками рибосома успевает образовать инициаторный комплекс с TIR в той части молекул мРНК, транскрипция которых еще не завершена.

Что касается плазмид с генами третьей группы, то необходимо отметить, что не все наблюдаемые эффекты могут найти простое объяснение только отсутствием комплементарности мTIR с дистальными участками мРНК. Так, если участок, повторяющий сайты UB и SD находится в начальной части гена (плазида б), то экспрессия гена очень высока. Однако введение той же последовательности вблизи терминирующего кодона (плазмиды e и ж2) с появлением аргининовых кодонов AGA и AGG (см. рис. 3) приводит к резкому падению уровня экспрессии. В то же время в плазмиде (ж1), содержащей тот же структурный элемент, что и плазида (ж2), но находящийся после терминирующего кодона, уровень экспрессии гена *il3* был очень высоким. Поэтому мы предполагаем, что ингибирующее влияние такой последовательности в дистальной области мРНК сказывается в первую очередь на процессе элонгации, а не инициации трансляции.

С целью использования найденных зависимостей для конструирования экспрессионных плазмид, мы изучили возможность повышения уровня экспрессии гена за счет конкурентного подавления комплементарного взаимодействия в его структурной части и участке TIR. Для этого мы сконструировали плазмиду (u). Ее структура аналогична структуре плазмиды (в) с ограниченным участком комплементарности с TIR (12 нт) между сайтами *HpaI* и *HindIII*, но содержит после терминирующего кодона вставку по сайту *EcoRI*, спо-

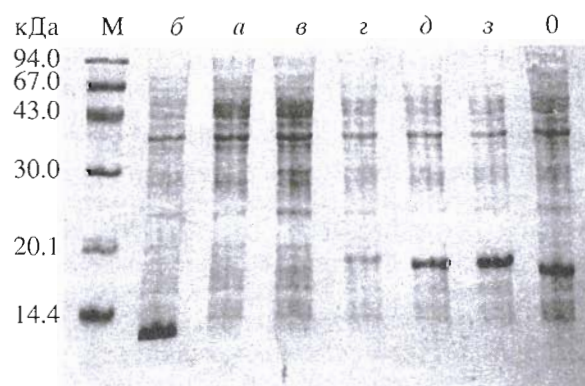


Рис. 4. Электрофореграмма тотальных лизатов клеток-продуцентов *E. coli* с рекомбинантными плазмидами после индуцированного IPTG биосинтеза белков. М – стандарты молекулярных масс; над колонками указаны обозначения плазмид в продуцентах, в соответствии с рис. 1 и таблицей. Полосы в районе 12–22 кДа соответствуют продуктам генов, указанных в таблице. (0) – *il3*.

собную к комплементарному взаимодействию с участком размером 23 нт, включающим в себя 12-членный фрагмент *HpaI*–*HindIII*. Таким образом, в плазмиде (*u*) эффект комплементарного взаимодействия структурного гена с TIR мог бы конкурентно подавляться. Оказалось, однако, что уровень экспрессии генов в этих плаزمидках отличается лишь незначительно (см. таблицу), что вновь указывает на ослабление комплементарных взаимодействий с удалением соответствующих участков в мРНК.

Таким образом, данные сравнения уровней экспрессии генов *in vivo* позволяют предполагать, что комплементарные взаимодействия TIR с участками кодирующей части мРНК непосредственно влияют на процесс трансляции и что эффективность комплементарных взаимодействий уменьшается с увеличением расстояния между взаимодействующими областями. Вторичная структура, образованная TIR и близко расположенным участком мРНК, более реальна и оказывает ингибирующее влияние на уровень экспрессии генов, несмотря на наличие в мРНК других участков, способных образовывать энергетически более выгодные структуры с этими элементами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, акриламид, *N*, *N'*-метиленабисакриламид, персульфат аммония (Merck); агарозу, АТФ, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевины, "ос. ч." (Реахим); агар, Триптон, дрожжевой экстракт (Difco); [γ - 32 P]АТФ, [α - 32 P]dАТФ (2000 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); рестриктазы эндонуклеазы (КФ 32.1.23x) *EcoRI*, *KspAI* (*HpaI*), *HindIII*, *Sall* (Fermentas, Литва); штаммы *E. coli*: XLI-Blue [*recA1*, *lac*⁻, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *sup E44*, *rel A1* (F' *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ*ΔM15, Tn10)]; BL21(DE3) [F⁻, *hsdSgal*, *ompT*, r_B⁻, m_B⁻].

Защищенные олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102U (БИОССЕТ, Новосибирск) и после деблокирования выделяли, как описано в работе [7]. Условия экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, трансформации компетентных клеток, клонированию, а также гель-электрофорезу и выделению ДНК из гелей приведены в работе [8].

Отбор клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды, осуществляли с помощью гибридизации колоний с использованием радиоактивных зондов. Для определения ориентации вставок с одинаковыми липкими концами в синтетических дуплексах проводили ПЦР, используя в качестве

матрицы исследуемую плазмиду, а в качестве праймеров – один из составляющих дуплекс олигонуклеотидов и олигонуклеотид, гомологичный последовательности гена *il3*.

Штаммы *E. coli* BL21(DE3), содержащие экспрессионные плазмиды, выращивали в питательной среде YT при 37°C до значения оптического поглощения культуры A₅₉₅, равного 0.5, затем добавляли IPTG (концентрация в среде 0.2 мМ) и инкубировали еще 6 ч. Для анализа белков 1 мл бактериальной культуры центрифугировали, растворяли в лизирующем буфере [9], нагревали 5 мин при 100°C и белки разделяли в 15% ПААГ в присутствии 0.1% SDS [9]. Гели прокрашивали кумаси R-250 и сканировали на сканере Microtek; интегрирование пиков проводили по программе SigmaGel (Jandel.). Содержание белка измеряли в параллельных 8–10 клонках продуцента. Относительная ошибка измерений при этом составляла не более 10%. Если содержание целевого белка составляет более 25% от 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, Институт ФХБ им. Белозерского, МГУ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич А.И., Есипов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 117–123.
2. Гуревич А.И., Есипов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 282–288.
3. Гуревич А.И., Есипов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 888–894.
4. Есипов Р.С., Гуревич А.И., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И., Шевченко Л.В., Плужников К.А., Гришин Е.В. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 949–952.
5. Emory S.A., Belasco J.G. // J. Bacteriol. 1990. V. 8. P. 4472–4481.
6. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.-Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. P. A12.
7. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 629–932.
8. Гуревич А.И., Некрасова О.В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 149–152.
9. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

**The Dependence of the *E. coli* Gene Expression Level
on the Structure of the Translation Initiation Region (TIR).**

IV. Distal Complementary TIR Interactions with the mRNA Coding Region

R. S. Esipov#, A. I. Gurevich*, A. L. Kayushin*, M. D. Korosteleva*, and M. A. Belova****

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

***Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, Moscow oblast, 141700 Russia*

To evaluate the effect on translation of distal regions of the encoding mRNA part capable of the complementary binding to the ribosome binding site (RBS), a series of plasmids were constructed containing fragments inserted into the *il3* gene and determining secondary interactions in mRNA. A comparison of the levels of the *in vivo* gene expression showed that the complementary interactions of the translation initiation region (TIR) with distal regions of the mRNA encoding part affect translation. The effectiveness of these interactions decreased with an increase in the distance between the RBS and the complementary mRNA region, whereas the secondary structure formed by the TIR and the adjacent mRNA region was more stable despite the presence of regions in mRNA capable of forming energetically more favorable structures involving these elements.

Key words: mRNA, RNA secondary structure, translation initiation region

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7247; e-mail: esipov@ibch.siobc.ras.ru.