



УДК 577.217.35

ШТАММ *Escherichia coli*, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ БЕЗЛИДЕРНУЮ мРНК С ХРОМОСОМНОГО *lac*-ПРОМОТОРА

© 2005 г. А. В. Комарова*, Л. С. Чуфистова, Л. В. Асеев, И. В. Бони[#]Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16 / 10

Поступило в редакцию 21.04.2005 г. Принято к печати 23.05.2005 г.

Для изучения механизма трансляции мРНК, не имеющих 5'-нетранслируемого лидера, создан специализированный штамм *Escherichia coli*, продуцирующий безлидерную *lacZ*-мРНК с хромосомного *lac*-промотора. Эффективность трансляции такой неканонической мРНК чрезвычайно низка по сравнению с обычными клеточными матрицами, но возрастает на порядок в присутствии хромосомных мутаций в генах рибосомных белков S1 и S2. Созданный штамм обладает неоспоримыми преимуществами по сравнению с плазмидными конструкциями (в первую очередь, благодаря сохранению дозы гена) и открывает широкие возможности для исследования специфических условий трансляции безлидерных мРНК *in vivo* с помощью молекулярно-генетических подходов.

Ключевые слова: безлидерные мРНК, механизм экспрессии; рибосомные белки S1 и S2.

Безлидерные мРНК, по определению, не имеют 5'-нетранслируемой области (мРНК-лидера) и несут инициаторный кодон на 5'-конце, то есть начало транскрипции в данном случае совпадает с началом трансляции (для обзора см. [1, 2]). Подобные мРНК встречаются во всех трех царствах живых организмов (Eubacteria, Archaea, Eukarya), но они лишены специфических черт как эукариотических (наличие кэп-структуры), так и прокариотических (наличие домена Шайна-Дальгарно) матриц, определяющих особенности механизмов сборки трансляционных инициаторных комплексов. Это позволило предположить, что безлидерные матрицы представляют собой архаичную форму информационных РНК и, таким образом, их экспрессия должна подчиняться универсальному эволюционно консервативному механизму [1, 2]. Базовые принципы такого универсального механизма пока не сформулированы.

Если трансляция безлидерных мРНК подчиняется общим закономерностям независимо от типа клеток, то наиболее удобным для исследований *in vivo* является всесторонне исследованный модельный организм *Escherichia coli*. Известны три безлидерные мРНК, специфичные для *E. coli*, но кодируемые экзогенными генетическими элементами. Хромосомные гены *E. coli*, экспрессирующие безлидерные транскрипты, пока не найдены. Исторически первой была открыта мРНК, синтези-

руемая с P_{RM} -промотора фага λ при лизогении и кодирующая *cI*-репрессор [3]. Две другие мРНК кодируют TetR-репрессор транспозона Tn 1721 [4] и белок гена *V* бактериофага P2 [5]. Следует отметить, что в этих случаях не требуется высокого уровня экспрессии, так как всего несколько молекул репрессора на клетку достаточно для выполнения его функции, и это предполагает, что трансляция безлидерных мРНК в *E. coli* запрограммирована как неэффективная.

Исследования механизма экспрессии безлидерных мРНК в *E. coli* проводились, как правило, либо в экспериментах *in vitro* [6–9], либо *in vivo* с помощью плазмидных конструкций, несущих трансляционно слитые гены типа *cl-lacZ* [10–14]. В результате этих исследований были найдены интересные особенности трансляции безлидерных мРНК, такие, как способность к образованию инициаторных комплексов с недиссоциированными 70S рибосомами *in vitro* [6–10], усиление трансляции *in vivo* в присутствии хромосомных мутаций по гену *rpsB*, кодирующему рибосомный белок S2 [11], устойчивость к антибиотику касугамицину [8, 12]. Однако оба эти подхода имеют существенные ограничения. Так, в экспериментах *in vitro* невозможно воспроизвести ситуацию конкуренции со стороны клеточных матриц и смоделировать реальные концентрации компонентов-участников, а при трансляции *in vivo* с плазмидных конструкций невозможно учесть реальную дозу гена, так как копияность плазмид может меняться с изменением скорости роста клеточной культуры, температуры, в присутствии различных мутаций.

* Адрес в настоящее время: Unité Régulation de la Traduction Eucaryote et Virale, CNRS URA 1966, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330 69 92; факс: (095) 330 65 38; эл. почта: igina@humgen.iobc.ras.ru).

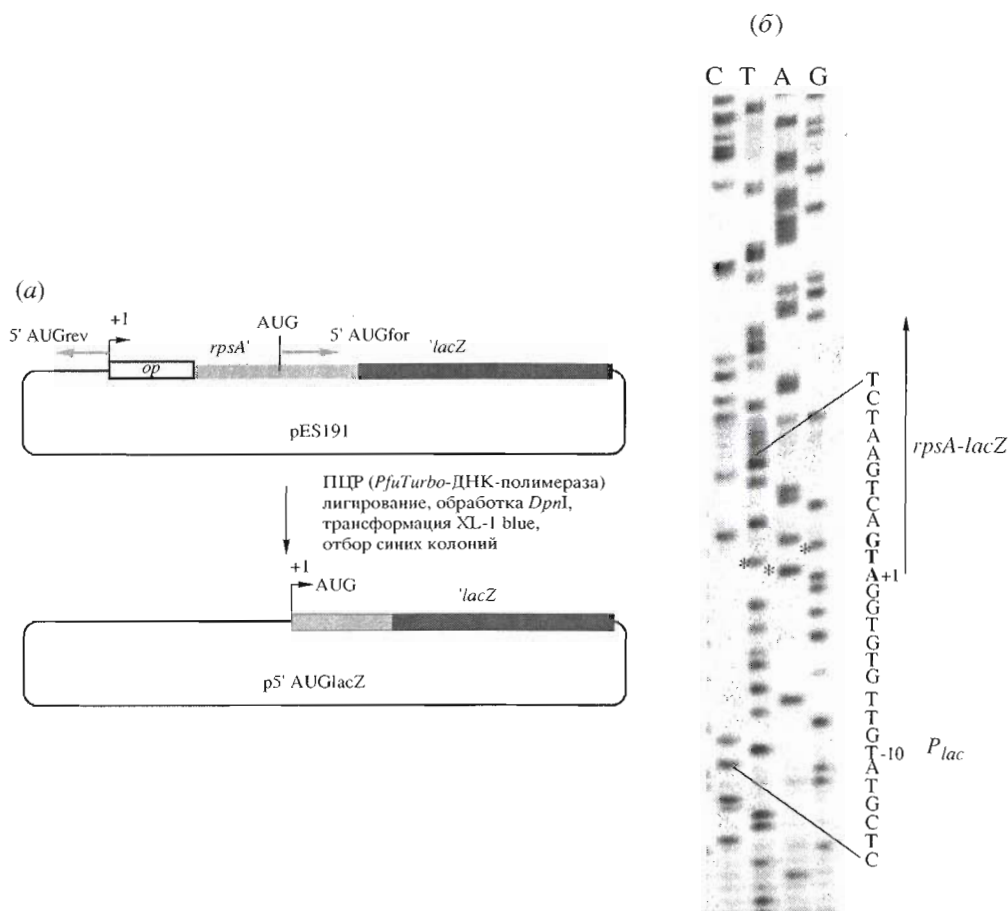


Схема получения плазмиды $p5'AUGlacZ$ (а) для синтеза безлидерной $lacZ$ -мРНК под контролем lac -промотора, и результаты ее секвенирования (б) по методу Сэнгера с праймера U_{lac} ($5' GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCC$), соответствующего позициям от -64 до -41 относительно старта транскрипции (+1) с lac -промотора (P_{lac}). Обозначения на схеме: op – lac -оператор, $lacZ$ – кодирующая последовательность гена α -пептида β -галактозидазы без первых семи кодонов; $rpsA'$ – последовательность 5'-концевой части гена $rpsA$, включающая 5'-нетранслируемую область и первые 19 кодонов кодирующей области; $5'AUG_{for}$ и $5'AUG_{rev}$ – прямой и обратный праймеры для ПЦР.

Для корректного сравнения эффективности трансляции мРНК с различной структурой регуляторных областей (например, безлидерных мРНК и обычных клеточных матриц) в экспериментах *in vivo* необходимо, чтобы мРНК синтезировались с одного промотора и с однокопийного гена (хромосомного), а выход белкового продукта оценивался количественно в стандартной системе. Этим требованиям полностью удовлетворяет метод, основанный на оценке активности β -галактозидазы, когда синтезируемая с хромосомного lac -промотора $lacZ$ -мРНК вместо аутентичной области инициации трансляции несет экзогенные регуляторные участки [15]. Такой подход позволяет корректно сравнивать трансляционные инициаторные районы (ТИР) как природные [15–17], так и искусственные [18, 19], по их эффективности в белковом синтезе в присутствии различных хромосомных мутаций. В данной работе мы дополнили коллекцию штаммов *E. coli*, несущих экзогенные ТИР перед хромосомным $lacZ$ -геном, специализированным

штаммом, в котором транскрипция $lacZ$ -мРНК с хромосомного lac -промотора начинается непосредственно с инициаторного AUG-кодона.

Для создания штамма сначала была получена плазмиды, экспрессирующая безлидерный $lacZ$ -транскрипт, кодирующий α -пептид β -галактозидазы (рисунок, а). В исходной плазмиде $pES191$ [17] синтез этого пептида на уровне транскрипции контролируется lac -промотором и оператором, а на трансляционном уровне – ТИР гена $rpsA$. С помощью ПЦР мы делетировали последовательность между точкой начала транскрипции (+1) и инициаторным кодоном $rpsA$ ТИР (рисунок, а), и в результате получили плазмиду $p5'AUGlacZ$, в которой транскрипт с lac -промотора начинается с инициаторного кодона AUG, что доказано секвенированием (рисунок, б).

Далее, согласно стандартной схеме [15, 17], полученной плазмидой $p5'AUGlacZ$ трансформировали клетки штамма ENSO, Лас⁻фенотип которого определяется делецией небольшого участка

хромосомы, включающего *lac*-промотор и ТИР *lacZ*. По механизму гомологичной рекомбинации *lac*-промотор и начало кодирующей части *lacZ*-мРНК из плазмиды р5'AUGlacZ переносились на хромосому, в результате чего рекомбинантные клетки приобретали Lac⁺-фенотип, позволяющий проводить их отбор на селективной среде McConkey. Полученный специализированный штамм, продуцирующий безлидерную *lacZ*-мРНК, назван KB5'AUGlacZ.

Как уже упоминалось выше, отличительной особенностью безлидерных мРНК является многократное усиление их экспрессии в присутствии хромосомных мутаций по гену *rpsB* [11]. Мутации *rpsB1(ts)* и *rpsB11(rpsB::IS1)* переносили в новый штамм с помощью P1-трандукции. Оба мутанта растут на агаровой среде медленнее, чем дикий тип, что облегчает первичный отбор мутантных колоний. Наличие *rpsB1*-мутации доказывали температурным тестом (мутанты не способны к росту при 42°C), а наличие инсерционного элемента *IS1* в *rpsB11*-клетках доказывали с помощью ПЦР. Тест на активность β-галактозидазы показал, что экспрессия *lacZ*-мРНК в контрольных (*rpsB*⁺) клетках очень низка, но усиливается в 8–10 раз в *rpsB*-мутантах (таблица). Параллельные эксперименты с изогенными *rpsB*⁻ и *rpsB*-мутантными штаммами, в которых синтез β-галактозидазы управляется канонической областью инициации трансляции мРНК *galE* (конструкция *galE::lacZ* описана ранее в работах [15, 17]), показали, что значимого изменения уровня трансляции канонической мРНК в мутантных клетках не наблюдается (данные не приведены). Таким образом, полученные результаты позволяют с полным основанием утверждать, что новый штамм KB5'AUGlacZ продуцирует β-галактозидазу с безлидерной мРНК.

Теоретически, *rpsB*-мутации должны супрессироваться в присутствии дикого белка S2, синтезируемого с плазмиды. Для создания плазмиды рS2, экспрессирующей ген белка S2, участок геномной ДНК *E. coli*, включающий ген *rpsB* с соответствующим промотором и терминатором [20], был амплифицирован с помощью ПЦР и встроен в Tet-область вектора рACYC184 (Cm, Tet). В *rpsB*⁺-клетках присутствие плазмиды рS2 вызывало замедление роста культуры; этот описанный ранее [20] феномен пока не нашел адекватного объяснения. В случае *rpsB1(ts)*-мутанта наблюдалась ожидаемая супрессия: рS2-трансформанты приобретали способность к росту при 42°C, что прямо доказывает экспрессию гена дикого белка S2 с плазмиды. Более того, в присутствии плазмиды рS2 наблюдалось падение эффективности синтеза β-галактозидазы с безлидерной мРНК *lacZ* до уровня, наблюдаемого в *rpsB*⁺-штамме (таблица).

Таким образом, мы доказали, что синтез белка с безлидерной матрицы в новом штамме

Влияние на уровень синтеза β-галактозидазы в штамме KB5'AUGlacZ мутаций по генам *rpsB* и *rpsA*, а также плазмид рS1 и рS2*, экспрессирующих гены рибосомных белков S1 и S2

Гены <i>rpsA/rpsB</i> в хромосоме	Плазмиды в клетке	Активность β-галактозидазы**
<i>rpsA</i> ⁺ / <i>rpsB</i> ⁺	рACYC184	90 ± 15
<i>rpsA</i> ⁺ / <i>rpsB1(ts)</i>	рACYC184	980 ± 60
<i>rpsA</i> ⁺ / <i>rpsB1(ts)</i>	рS2	110 ± 10
<i>rpsA</i> ⁺ / <i>rpsB11(rpsB::IS1)</i>	рACYC184	820 ± 75
<i>rpsA</i> ⁺ / <i>rpsB11(rpsB::IS1)</i>	рS2	***
<i>ssyF29(rpsA::IS10)/rpsB</i> ⁺	рACYC184	850 ± 100
<i>ssyF29(rpsA::IS10)/rpsB</i> ⁺	рS1	65 ± 10

* Плазмиды рS1 и рS2 – производные вектора рACYC184, в который клонированы гены *rpsA* и *rpsB*, соответственно, с собственными промоторными и терминаторными областями.

** Активность β-галактозидазы, выраженную в нмоль *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды, гидролизуемого за мин 1 мг суммарного растворимого клеточного белка, измеряли как описано ранее [18].

*** Трансформация плазмидой рS2 приводит к нежизнеспособным клеткам; причины пока не известны.

KB5'AUGlacZ подчиняется закономерностям, обнаруженным ранее для классической безлидерной мРНК репрессора *cI* фага λ [11], а именно – усиливается на порядок в присутствии хромосомных мутаций по гену *rpsB*, кодирующему рибосомный белок S2.

Первоначально предполагалось, что такое усиление связано с тем, что в *rpsB*-мутантах часть рибосом дефицитна по белку S2, из-за чего открывается возможность взаимодействия начала кодирующей области мРНК *cI* с 16S рРНК [11]. Однако последующие работы [21, 22] показали отсутствие такого взаимодействия. Известно, что в *rpsB1*-мутанте повышена доля рибосом, дефектных не только по белку S2, но и по белку S1, взаимодействующему с S2 в составе 30S-рибосомной субчастицы [23]. Мы предположили, что если механизм усиления трансляции безлидерных матриц связан с дефицитом S1, а не S2, то аналогичный эффект должен наблюдаться в *rpsB*⁺-клетках, мутантных по гену *rpsA*. Такой мутант (*ssyF29*) ранее был охарактеризован в работах нашей группы [17, 24]. Включение инсерционного элемента *IS10R* в 3'-область гена *rpsA* (*rpsA::IS10*) в этом мутанте приводит к дестабилизации мРНК *rpsA* и, как следствие, к понижению скорости накопления в клетках укороченной, но активной в трансляции формы белка S1 [17]. Введение *rpsA::IS10*-мутации в штамм KB5'AUGlacZ с помощью P1-трандукции действительно привело к повышению экспрессии безлидерной мРНК на порядок (таблица). Как и ожидалось, этот эффект усиления полностью снимался в присутствии плазмиды рS1, экспрессирующей ген белка S1 дикого типа

(таблица). Полученные данные являются первым прямым молекулярно-генетическим доказательством того, что эффект *rpsB*-мутаций не первичен, и механизм усиления трансляции безлидерных мРНК в этом случае связан с дефицитом белка S1 в рибосомах. Результаты настоящей работы открывают широкие перспективы использования нового штамма KB5'AUGlacZ в исследованиях механизма трансляции безлидерных мРНК *in vivo*, например, при различных стрессах, в присутствии хромосомных мутаций и/или белковых факторов, синтезируемых с плазмид.

Авторы выражают благодарность Матиасу Шпрингеру (Франция) и Макс Готтесману (США) за предоставление штаммов для трансдукции *rpsB1*- и *rpsB11*-мутаций. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 03-04-49131) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Janssen G.R. // Eubacterial, Archaeobacterial, and Eucaryotic Genes that Encode Leaderless mRNA. In: Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics / Eds Baltz R.H., Hegeman G.D., Skatrud P.L. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1993. P. 59–67.
2. Moll I., Grill S., Gualerzi C.O., Blasi U. // Mol. Microbiol. 2002. V. 43. P. 239–246.
3. Ptashne M., Backman K., Hamayun M.Z., Jeffrey A., Maurer R., Sauer R.T. // Science. 1976. V. 194. P. 156–161.
4. Klock G., Hillen W. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189. P. 633–641.
5. Christie G.F., Calendar R. // J. Mol. Biol. 1985. V. 181. P. 373–382.
6. Balakin A.G., Skripkin E.A., Shatsky I.N., Bogdanov A.A. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 563–571.
7. Moll I., Blasi U. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 297. P. 1021–1026.
8. O'Donnel S.M., Janssen G.R. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 6730–6733.
9. Udagava T., Shimizu Y., Ueda T. // J. Biol. Chem. 2003. V. 279. P. 8539–8546.
10. Moll I., Hirokawa Go, Kiel M.C., Kaji A., Blasi U. // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 3354–3363.
11. Shean C.S., Gottesman M.E. // Cell. 1992. V. 70. P. 513–522.
12. Chin K., Shean C.S., Gottesman M.E. // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 7471–7473.
13. O'Donnel S.M., Janssen G.R. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 1277–1283.
14. Martin-Farmer J., Janssen G.R. // Mol. Microbiol. 1999. V. 31. P. 1025–1038.
15. Dreyfus M. // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. P. 79–94.
16. Yarchuk O.N., Jacque N., Guillerez J., Dreyfus M. // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 581–596.
17. Boni I.V., Artamonova V.S., Dreyfus M. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 5872–5879.
18. Komarova A.V., Tchufistova L.S., Supina E.V., Boni I.V. // RNA. 2002. V. 8. P. 1137–1147.
19. Komarova A.V., Tchufistova L.S., Dreyfus M., Boni I.V. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 1344–1349.
20. An G., Bendiak D.C., Mamelak L.A., Friesen J.D. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. P. 4163–4172.
21. Resch A., Tedin K., Grundling A., Mundlein A., Blasi U. // EMBO J. 1996. V. 15. P. 4740–4748.
22. O'Connor M., Asai T., Squires C.L., Dahlberg A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 8973–8978.
23. Bollen A., Lathe R., Herzog A., Denicourt D., Lecocq L., Desmarez L., Lavallo R. // J. Mol. Biol. 1979. V. 132. P. 219–233.
24. Артамонова В.С., Бони И.В. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 941–943.

An *Escherichia coli* Strain Producing a Leaderless mRNA from the Chromosomal *lac* Promoter

A. V. Komarova, L. S. Chufistova, L. V. Aseev, and I. V. Boni[#]

[#]Phone: +7 (095) 330-6992; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: irina@humgen.siohc.ras.ru
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

A special *Escherichia coli* strain capable of producing a leaderless *lacZ* mRNA from the chromosomal *lac* promoter was constructed to study the mechanism of leaderless mRNA translation. The translation efficiency of this noncanonical mRNA is very low in comparison with the canonical cellular templates, but it increases by one order of magnitude in the presence of chromosomal mutations in the genes encoding the ribosomal S1 and S2 proteins. The new strain possesses obvious advantages over the commonly used plasmid constructs (first of all, due to the constant dosage of *lacZ* gene in the cell) and opens possibilities for investigation of the specific conditions for leaderless mRNA translation *in vivo* using molecular genetic approaches. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: leaderless mRNAs, expression mechanism; ribosomal proteins S1 and S2