

ОРДЕНА ЛЕНІНА ТА ОРДЕНА ДРУЖБИ НАРОДІВ  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

УДК 577.21

**Вудмаска Марія Іванівна**

**Вивчення факторів, що впливають на стабільність рекомбінантних  
конструкцій, які містять гени rif-оперона ентеробактерій**

03.00.03 - молекулярна біологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на пошування вченого ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1995

544.2



00761640 (0)

Роботу виконано у відділі  
кислот Інституту молекуляр

Науковий керівник: доктор біологічних наук Є.В.Патон

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук О.П.Соломко  
член-корреспондент НАН України,  
доктор біологічних наук В.П.Мацелюх

Ведуча організація: Київський Національний Університет  
імені Тараса Шевченка

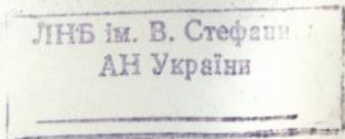
Захист дисертації відбудеться 19 грудня 1995 року о 10:00  
годині на засіданні спеціалізованої ради Д 016.011.01 по за-  
хисту дисертацій на пошукання вченого ступеня кандидата біоло-  
гічних наук при Інституті молекулярної біології і генетики НАН  
України за адресою: 252143, Київ-143, вул.Заболотного,150.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту мо-  
лекулярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розіслано 17 листопада 1995 року.

Учений секретар  
спеціалізованої ради,  
канд. біол. наук

Л. Л. Лукаш



АКТУАЛЬНІСТЬ ТЕМИ. Вивчення факторів, що визначають стабільне підтримання в клітині чужорідного генетичного матеріалу, сьогодні актуальне для фундаментального та прикладного напрямку. З погляду фундаментальної науки інтерес викликає взаємодія власного геному клітини і чужорідного генетичного матеріалу, який може змінюватись в результаті цієї взаємодії. Не дивлячись на великий об'єм отриманих даних про процеси, пов'язані з підтриманням у клітині чужорідного генетичного матеріалу, залежність стабільності рекомбінантів від впливу продуктів, що експресуються, на регуляцію генної експресії в клітині-хазяїні має виключно важливе значення для розуміння цих процесів. Вивчення причин нестабільності рекомбінантних ДНК дозволяє зрозуміти механізми роботи штучно сумісних систем генів та закономірності їх експресії, а також допомагає знайти підходи до рішення проблеми нестабільності.

Важливість фактору стабільності для прикладного напрямку полягає в необхідності забезпечувати підтримання експресії у клітині генів, що кодують потрібні продукти.

Гени, що кодують синтез рибосомних білків *E.coli*, є прикладом досягнення гранично високої експресії за допомогою природних механізмів. З цієї причини вивчення нестабільності на даній моделі цікаве для створення систем в високому рівні експресії необхідного білку. При створенні таких систем для досягнення максимальної експресії проводять злиття кількох генів, у яких регуляція експресії підпорядкована. Визначення факторів, що забезпечують стабільність рекомбінантів, які містять гени *rif*-оперону, та дослідження можливості підвищення стабільності за рахунок введення елементів, причетних до експресії, а також вивчення можливості регуляції експресії *L10* спорідненого організму у клітині *E.coli* збагачує наші знання та сприяє розумін-

ню цього феномену в таких штучно створюваних системах.

З цього погляду пропонується робота становить науковий інтерес.

**МЕТА І ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Основною метою даної роботи було вивчення взаємозв'язку між регуляцією експресії генів *rif*-оперону ентеробактерій та стабільністю конструкцій, що несуть гени цього оперону.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1) отримати рекомбінантні конструкції, які несуть фрагмент кластера *rplA'*JL-*groBC* оперону *E.coli*.

2) модифікувати отримані рекомбінанти введенням елементів генетичного регуляторного оточення та забезпеченням варіювання рівнів експресії;

3) ізолювати ген *rplJ* *Salmonella typhimurium* та отримати рекомбінанти, що несуть ген *rplJ* *S.typhimurium*;

4) вивчити можливість перехресної регуляції експресії між двома спорідненими бактеріями - *E.coli* та *S.typhimurium*.

**НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ.** В даній роботі отримані рекомбінантні конструкції, які містять гени *rif*-оперона *E.coli* та досліджені фактори, що впливають на стабільне підтримання цих рекомбінантів. Доведено, що нестабільність рекомбінантних молекул є наслідком високого рівня експресії гену *rplJ* *E.coli*.

Шляхом введення у клітини додаткових копій генів кластера *rplA'*JL вперше вивчено зв'язок між "дозою генів" кластера *rplA'*JL та рівнем негативного впливу її на життєздатність нормальних клітин *E.coli*.

Вперше клоновано ген *rplJ* *S.typhimurium*, що кодує регуляторноздатний білок L10. Встановлено, що регуляторноздатний білок L10 *S.typhimurium* подавляє експресію генів *rplJL* *E.coli* та

збереження регуляторної функції зумовлене високою гомологією білків L10 *E.coli* та *S.typhimurium*. Проведене визначення первинної структури гену *rplJ* *S.typhimurium* та проведений порівняльний аналіз амінокислотної послідовності регуляторноздатного білку L10.

**СТРУКТУРА І ОБ'ЄМ РОБОТИ.** Дисертацію викладено на стор.130. машинописного тексту. Вона складається з вступу, огляду літератури, методичної частини, опису результатів та їх обговорення і висновків. Роботу ілюстровано 15 рисунками і 4 таблицями. Список цитованої літератури містить 132 джерела.

**АПРОБАЦІЯ.** Матеріали дисертації доповідались на IUMS Congress: Bacteriology and Mycology (Осака, 1990), на міжнародній, пам'яті Х.Г.Вітмана, конференції по трансляційному апарату (Берлін,1992). За матеріалами дисертації опубліковано 10 статей.

#### ЗМІСТ РОБОТИ

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** Всі використані у роботі ферменти виробництва НВО "Ферментас", Вільнюс. Ферментативні реакції проводили за рекомендаціями та у буферних розчинах виробника. Отримання компетентних клітин *E.coli* та їх трансформацію проводили, як описано у (Nashimura et al., 1990), визначення бета-галактозидазної активності виконували за методикою (Міллер,1976), плазмідну ДНК для секвенування виділяли як описано у (Saunders and Burke, 1990), реакції секвенування виконувались, вцілому, згідно інструкції набору "T7 Сиквенс", НПО "Ферментас", Литва. Приготування, електрофорез, обробку та висушування секвенсового 6%-ного розклиненого гелю виконували, згідно інструкції виробника, на приладі MacroPhor Sequencing System (LKB, Швеція).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для клонування гену *groB* в-субодиниці РНК-полімерази *colI* обрали ген *groB* з домінантною мутацією стійкості до рифампіцину, *groB<sup>R</sup>*, що містився у фагові  $\lambda$ gif<sup>d18</sup> та в сконструйованій Д.Коллінсом косміді pJC703 (Collins J., 1979) і який є частиною оперону, що містить гени рибосомних білків *rplJ*, *rplL* та частину гену *rplA'* ( вони відповідно кодують білки L10, L7/L12 та L1), а також гени *groB* та частково ген *groC'*, що кодують  $\beta$ - та  $\beta'$ -субодиниці РНК-полімерази *E.coli*. Транскрипція вказаних генів спрямовується сильним промотором P<sub>J</sub> (P<sub>L10</sub> ).

Після аналізу рекомбінантних ДНК з рифампіцинстійких клонів виявилось, що усі вони містять клонований фрагмент лише в одній орієнтації; при якій напрямок транскрипції, що ініціюється з фагового промотору P<sub>fac</sub> та власного промотору клонованого фрагменту P<sub>L10</sub>, однаковий (рис.1). При повторній трансформації клітин такими рекомбінантами лише 65% колоній були стійкими до рифампіцину, тобто, рекомбінанти були нестабільними.

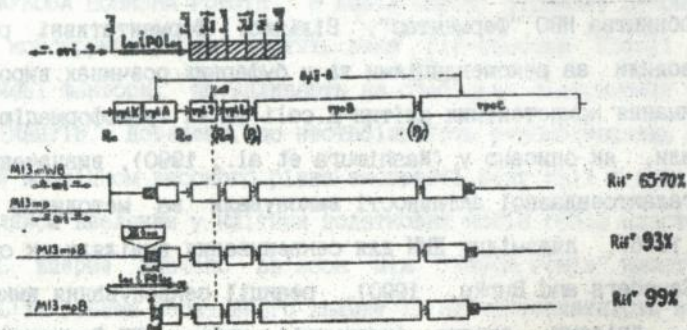


Рис.1. Схема конструювання рекомбінантних фагів на основі M13 та фрагменту *rplA'*JL-*groB*С ДНК *E.coli*. У відсотках вказана стабільність таких рекомбінантних конструкцій.

Обидва виявлені в роботі факти - і однаправлена орієнтація фрагмента в рекомбінантних фагах, і нестабільність

$\text{rif}^r$ -ознаки в них - вимагали встановити причину цих явищ, що дозволило б отримати стабільні рекомбінанти необхідні для функціональних досліджень.

Відомо, що клонування сильних промоторів пов'язане з певними труднощами; тому можна припустити, що однією з причин, що викликає однонаправлену орієнтацію клонованого фрагмента в рекомбінантних молекулах, є несприятливе для фагового генома поєднання двох сильних однонаправлених промоторів  $P_{lac}$  та  $P_J$ , які зумовлюють транскрипцію в одному і тому ж напрямку. При делеції промотора  $P_{lac}$  нам вдалось підвищити стабільність рекомбінантних фагів. Виявилось, що поєднання двох однонаправлених промоторів, які забезпечують високий рівень експресії клонованої ДНК, дійсно несприятливо впливає на стабільність рекомбінантних молекул. Це явище могли обумовити як занадто високий рівень транскрипції генів, що містяться у клонованому фрагменті, так і інші нерозпізнані фактори. Відомо, що однією з причин нестабільності рекомбінантної ДНК може бути підвищений рівень експресії чужорідних генів (Вельков В.В., 1983). У випадку генів  $\text{gplJ}$ - $\text{groBC}$  оперона *E. coli* відомо, що в клітинах *E. coli* надпродукція як  $\beta$ -субодиниці РНК-полімерази, так і рибосомного білку L7/L12, який кодується генами  $\text{groB}$  та  $\text{gplL}$  відповідно, цілком можлива та не справляє негативного впливу на їх життєдатність (Zengel J.M. & Lindhal L., 1991). Щодо рибосомного білка L10, кодованого геном  $\text{gplJ}$ , навпаки, показано, що підвищення його продукції в клітинах *E. coli* блокує синтез білка L7/L12, кодованого хромосомним геном  $\text{gplL}$ , та порушує складання рибосом, що є летальним для клітин (Zengel J.M. & Lindahl L., 1993). Оскільки досліджуваний фрагмент містив обидва гени  $\text{gplL}$  та  $\text{gplJ}$  і, таким чином, синтез білків L7/L12 та L10 проходив узгоджено, ми припускали, що підвищена експресія обох

генів може зумовлюватись порушенням узгодженої експресії даних генів з іншими (хромосомними) генами/оперонами *E.coli*. Знизити експресію клонованої ДНК можна вбудувавши сильний термінатор транскрипції після  $P_{lac}$ . Вибираючи термінатори, ми скористувались такими, від яких очікували високої ефективності *in vivo*. Як виявилось вставка термінаторів  $t_{\nu}$  та  $t_{oop}$  дійсно блокує транскрипцію ініційовану з промотора вектора; це дало змогу збільшити стабільність рекомбінантів (рис.1).

З викладеного вище випливає, що при клонуванні фрагменту кластера генів  $gplA'JL-groBC'$  оперону *E.coli* в фагах M13 цей фрагмент клонується в єдиній орієнтації таким чином, що напрямок транскрипції з промоторів  $P_J$  (фрагменту) та  $lac$  (вектору) однонаправлений. Такі рекомбінанти виявились нестабільними; однією з причин такої нестабільності, очевидно, є високий рівень експресії клонованого фрагмента ДНК, що забезпечується транскрипцією в одному напрямку з промоторів  $P_J$  та  $P_{lac}$ .

Ми дослідили можливість та ефективність клонування в плазмідах з різною копійністю, коли рівні експресії клонованих генів варіюють; було використано малокопійну pHSG415 (3-5 копій/клітину), середньокпійну pBR322 (19-26 копій/клітину) та мультикопійну pUC19 (155-175 копій/клітину) плазміди. Клонування проводили так само як у випадку фагових векторів.

Аналіз рекомбінантних плазмід на основі pHSG415 та pBR322 показав, що обидві плазміди можуть включати даний фрагмент в обох орієнтаціях. Виявилось, що такі рекомбінанти стабільні.

При рестрикційному аналізі рекомбінантів на основі мультикопійної плазміди pUC19 показано, що даний фрагмент вбудовувався в єдиній орієнтації; таким чином, що  $P_J$  ініціює транскрипцію у зустрічному напрямку (рис.2). Така орієнтація протилежна орієнтації його в рекомбінантних фагах. Причини цього

були не зрозумілими. Як і у випадку перших обох рекомбінантних плазмід, рекомбінанти на основі рUC були стабільні.

Однією з можливих причин єдиної, але протилежної орієнтації фрагменту при клонуванні його у плазміді рUC та фагах M13, таким чином, може бути детальність самих клонованих генів.

Беручи до уваги ці результати, ми клонували окремо гени, що входять до складу фрагменту *rplA'JL-rpoBC* оперону *E. coli*. Для цього розбили даний фрагмент на субфрагменти, що включають структурні частини генів *rplJL*, *rplJ* та *rplL* в промоторами, які направляють їх транскрипцію. Схема отримання таких рекомбінантних плазмід представлена на рис.2.

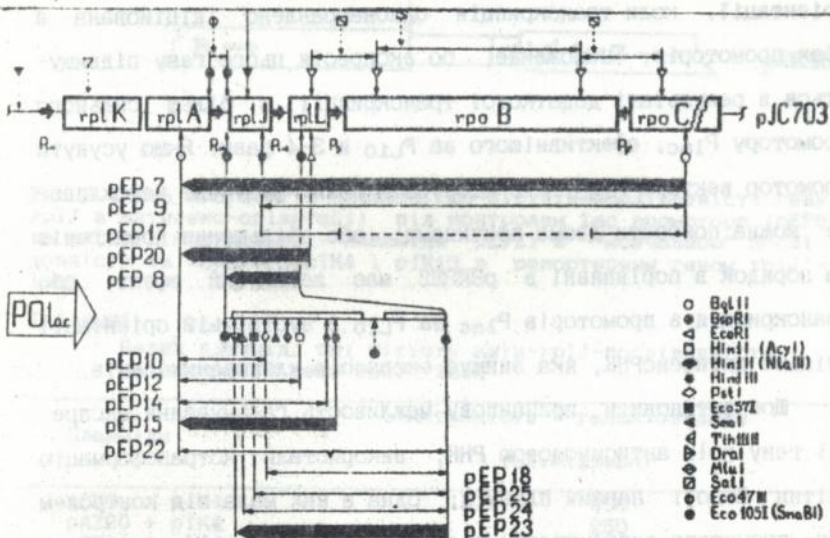


Рис.2. Схема конструювання рекомбінантних плазмід на основі рUC та фрагментів *rplAJL* генів *E. coli*. Жирною горизонтальною стрілкою показана єдина можлива орієнтація клонованих генів.

При клонуванні гену *rplL* в власним промотором нам вдалось

отримати рекомбінанти, що містили його в обох орієнтаціях. Ми переконались в тому, що експресія генів *gplJ* не впливає негативно на життєздатність нормальних клітин *E. coli* навіть при надекспресії продукту цього гену за умов прямої його орієнтації.

Клонування гену *gplJ* в власним промотором  $P_{L10}$  в плааміді  $pUC$  можливе тільки в одній орієнтації, коли транскрипції, ініційовані в промотора вставки та вектора, є зустрічними ( $pEP20$ ). Клонування самого гену *gplJ* також можливе тільки в одній орієнтації ( $pEP8$ ). Обидві плааміди негативно впливали на життєздатність клітин. Ймовірно, що клонування гену *gplJ* в орієнтації, коли транскрипція однонаправлено ініційована з обох промоторів, неможливе, бо експресія цього гену підвищується в результаті додаткової транскрипції з більш сильного промотору  $P_{lac}$ , ефективнішого за  $P_{L10}$  в 3-4 рази. Якщо усунути промотор вектора  $P_{lac}$ , то клонувати даний фрагмент неможливо. Це можна пояснити двома причинами: або збільшення дози генів на порядок в порівнянні з *pBR322* має летальний ефект, або транскрипція з промоторів  $P_{lac}$  та  $P_{L10}$  в зустрічній орієнтації ініціює антисенсРНК, яка знижує експресію клонованих генів.

Щоб встановити принципову можливість гальмування експресії гену *gplJ* антисмисловою РНК, використали котрансформацію клітин *E. coli* парами плаамід; одна з них мала під контролем  $lac$ -промотора антисмислову послідовність гену *gplJ*, друга ж містила детекторний ген *gplJ'*-*lacZ*. Причиною гальмування експресії гену його антисмисловою РНК на рівні трансляції є утворення дуплексу смислового та антисмислового ланцюгів РНК в втягненням в нього області ініціації трансляції, який блокує трансляцію смислової РНК (Green P.J. et al., 1986)). Відомо,

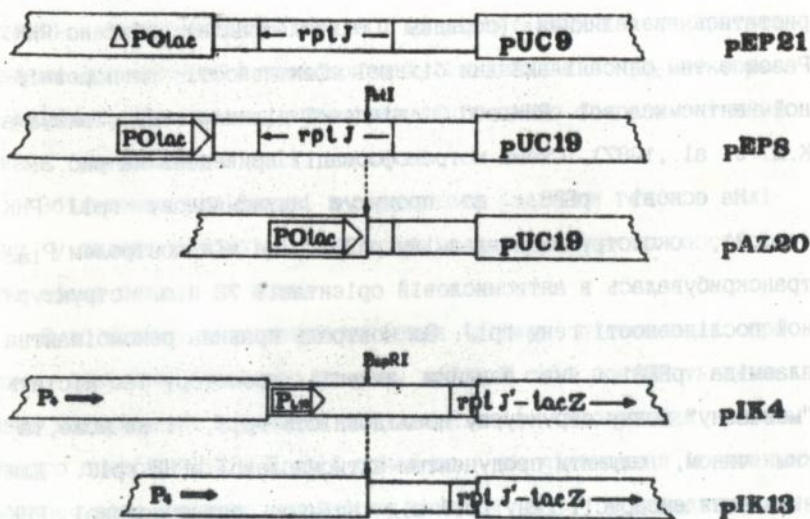


Рис.3.Схема фрагментів плазмід, що містять послідовність гену *rptJ* в антисенс-орієнтації під контролем *lac* промотора (рEP8 та pAZ20), контрольної плазмиди рEP21 з "мовчазною" послідовністю та плазмід pIK4 і pIK13 з репортерним геном *rptJ'-lacZ*.

Таблиця1

Вплив плазмід, які містять анти-*rptJ*-послідовність на експресію гену *rptJ'-lacZ*

| Плазмиди      | Активність β-галактозидази<br>(од.Міллера) |
|---------------|--------------------------------------------|
| рEP8 + pIK4   | 250                                        |
| рAZ20 + pIK4  | 250                                        |
| рEP21 + pIK4  | 280                                        |
| pIK4          | 300                                        |
| рEP21         | -                                          |
| рAZ20         | -                                          |
| рEP8 + pIK13  | 28                                         |
| рAZ20 + pIK13 | 3                                          |
| рEP21 + pIK13 | 31                                         |
| pIK13         | 38                                         |

що для направленої пригнічення експресії генів найкраще скористатись невеликими (порядку 100 нуклеотидів) антисенс-РНК. Разом з тим описані випадки більшої ефективності повнорозмірної антисмислової РНК або 3'-кінцевої ділянки гену (Такауама К.М. et al., 1987). Схема котрансформації приведена на рис.3.

На основі рЕР8, що продукує антисмислову rplJ РНК (рис.2), сконструювали плазмиду рАЗ20, де під контролем P<sub>lac</sub> транскрибувалась в антисмисловій орієнтації 72 п.о. структурної послідовності гену rplJ. За контроль правила рекомбінантна плазмиду рЕР21, яка завдяки делеції промотору lac містить "мовчазну" повну структурну послідовність rplJ, і не може, таким чином, служити продуцентом антисмислової мРНК rplJ. Для виявлення експресії гену rplJ під впливом антисмислової РНК використовували плазмиди рК4 та рК13, які дозволили судити про експресію тестерного гену rplJ'-lacZ за активністю β-галактозидази, що кодується ним (Крупская И.В. и др., 1990). Щоб забезпечити однакоє кількісне співвідношення смислової та антисмислової rplJ РНК, варіювали ефективність транскрипції тестерного гену. Так, у плазміді рК4 транскрипція гену rplJ'-lacZ направляється власним промотором P<sub>L10</sub>, який в 1,5 рази перевищує повністю індукований P<sub>lac</sub>, а у плазміді рК13 - промотором P<sub>4</sub>, на 2 порядки слабшим за P<sub>L10</sub>. Як видно з таблиці 1 отримані експериментальні дані дають можливість припустити можливе гальмування експресії гену rplJ під дією його антисмислової РНК. При цьому 72 п.о. 5'-кінцевої послідовності антисенс-РНК суттєвіше знижує експресію гену rplJ, ніж його повнорозмірна антисенс-РНК.

Отже, в описаного вище виходить, що токсичність високого рівня білкового синтезу, кодованого повним опероном rplJL, визначається геном rplJ. Тому клонування в плазміді рUC фраг-

ментів, які містять повні оперони  $gplJL$ , можливо у єдиній орієнтації, коли експресія генів, що містяться у них знижується завдяки конвергентній транскрипції, ініційованій  $P_{lac}$  вектора. Це свідчить про складну взаєморегуляцію цього оперону з іншими генами (операонами) *E.coli*.

Збільшення копійності в результаті введення генів в клітину у складі рекомбінантних плазмід дає можливість спостерігати ефект певної їх дози.

Було цікаво встановити чи існує рівень підвищення, при якому дози генів повного оперону  $gplJL$  *E.coli* починають негативно впливати на нормальні клітини *E.coli*. Клонування генів повного оперону  $gplJL$  *E.coli* показало, що підвищення їх дози, забезпечуване високою копійністю вектора  $pUC$ , призводить до летальних наслідків. Про негативний вплив збільшення в нормальних клітинах *E.coli* дози генів повного  $gplJL$ -оперону свідчать і особливості клонування цих генів у фагах на основі M13. Клонування цього фрагменту ДНК виявилось можливим у фагах в єдиній орієнтації, коли, на противагу  $pUC$ , напрям транскрипції с  $P_{lac}$  M13 співпадає з напрямком транскрипції клонованих генів з промотору  $P_{L10}$ . В даному випадку, ймовірно, причиною єдиної можливої орієнтації ДНК-вставки у всіх рекомбінантних фагах було те, що клонування сильного промотора  $P_{L10}$  в альтернативній орієнтації привело б до ініціації транскрипції "ori" область фагів і до загибелі останніх.

Як вказувалось вище, при клонуванні даного фрагменту оперону в плазмідах з низкою ( $pHSG415$ ) та середньою ( $pBR322$ ) копійністю ми не спостерігали будь-яких негативних явищ. Використання вектора з більшою копійністю -  $pUC$  - показало, що підвищення експресії завдяки індукції  $P_{lac}$  у всіх рекомбінантних плазмідах ДНК-вставка клонується тільки в орієнтації, про-

тилежній напрямкові  $\lambda$ с-промотора вектора. При делеції промотору вектора клонування даного фрагменту в плазміді стає неможливим. Цей факт вказує, що підвищення дози генів  $gplJL$ , зумовлене більшою копійністю вектора (приблизно у 8 разів  $\mu$ С порівнянні з  $pBR322$ ), виявляється летальним. Можливість клонування забезпечувалась синтезом з  $\lambda$ с-промотору антисенс РНК, яка знижувала експресію клонованих генів.

Кластер генів  $gplKAJL$  у ентеробактерій висококонсервативний за своєю структурно-функціональною організацією (Tittawella I.P.B., 1984). Для білка L1 ентеробактерій показана можливість регулювати експресію генів  $gplKA$  оперону *E.coli* (Sor F. & Nomura M., 1987). Нас цікавило, чи може білок L10 *S.typhimurium* здійснювати трансляційну репресію генів  $gplJL$  оперону *E.coli*. Якщо б це було так, то порівняти первинну структуру консервативних областей генів та білків, кодованих цими генами. Клонування гену  $gplJ$  *S.typhimurium* в плазмиду  $\mu$ С було можливим лише в єдиній орієнтації, протилежній  $P_{\lambda c}$ . Як і плазмиди  $pEP20$  в геном  $gplJ$  *E.coli*,  $pMW12$  негативно впливала на життєдіяльність нормальних клітин *E.coli* JM101 та стабільно підтримувалась в мутантному штамі JF3029. Використовуючи мутантний штам *E.coli* JF3029, ми намагались отримати рекомбінанти, які б містили фрагмент  $P_{L10-gplJ}$  *S.typhimurium* в альтернативній орієнтації. За допомогою цього штаму ми змогли отримати плазмиду ( $pMW12-1$ ), подібну плазміді з геном  $gplJ$  *E.coli* ( $pEP20-1$ ). Однак плазмиди  $pMW12-1$ , як і  $pEP20-1$ , характеризувалась зниженням копійності та швидко елімувала з клітин. Отже, незначне підвищення рівня експресії  $gplJ$  *S.typhimurium* за рахунок додаткової участі в транскрипції гену  $gplJ$  промотору  $P_{\lambda c}$  при спонтанному, неіндукованому рівні транскрипції виявилось критичним. Це свідчило про можливості регуляції генів

rplJL *E.coli* білком L10 *S.typhimurium*. Негативна дія високого рівня експресії гену rplJ *S.typhimurium* свідчить про здатність цього гетерологічного білка регулювати експресію генів rplJL оперону *E.coli*. Функціональна активність білка L10 *S.typhimurium* в *E.coli* зумовлена високою консервативністю його первинної структури та відповідно вторинної структури, необхідної для взаємодії з лідерною послідовністю-мішенню мРНК L10-L7/L12.

Порівняння нуклеотидної послідовності структурної області гену rplJ *S.typhimurium* виявило заміни в порівнянні з гомологічним геном *E.coli* в кодонах CGC<sub>45</sub> → CGT, CGT<sub>61</sub> → CGC, GCT<sub>110</sub> → GCA, CGT<sub>152</sub> → CGC, ACT<sub>153</sub> → ACA, GCG<sub>160</sub> → GCA, які не приводять до заміни амінокислот (рис.4). Відмінності в гені rplJ *S.typhimurium* в порівнянні з *E.coli*, що призводять до амінокислотних замін, спостерігались лише по кодонах GCT<sub>62</sub> → GTC, CCG<sub>67</sub> → CAG, GCA<sub>74</sub> → ACG. При замінах амінокислот Ala<sub>62</sub> → Val, Pro<sub>67</sub> → Gln, Ala<sub>74</sub> → Thr, отже, зберігається здатність L10 білка *S.typhimurium* взаємодіяти з послідовністю-мішенню на мРНК *E.coli* та гальмувати експресію генів rplJL оперону *E.coli*.

Виявивши спроможність білка L10 *S.typhimurium* пригнічувати експресію генів rplJL *E.coli*, було цікаво зробити кількісну порівняльну оцінку регуляторної здатності таких білків *in vivo*. Кількісна оцінка регуляторної здатності білків L10 в різних первинними структурами проводилась шляхом введення в мутантні клітини *E.coli* пар плазмід, одна з яких продукує L10, друга містить репортерний ген rplJ'-lacZ', рівень експресії якого давав можливість оцінювати регуляторну ефективність білка L10. Сайт взаємодії в L10 знаходиться в лідерній області мРНК L10-L12, тому репортерний ген rplJ'-lacZ для тестування

```

E.coli      GGCTCCGTCGAAGACCGCAGGAGTTTCGCAAGAACACTTAATCCCTGCGTAGACGGTGACAGAACGCTAAGATTATCTTTTATATCTGGCTTGTCTCTGCT
S.typhimurium -----C--C-----GG-----g-----g-----C-----

CACCGTAATTAAGACGCTCTCTCCGTTTGAGGAGTGAAGTGAAGTCCAGAGATTTCT CTGGCAAAATCCAGGAGCAAAAGTA
-----d-----TCT---GA--T-----G--ACA-GAG-T-C-----

E.coli      ATG GCT TTA AAT CTT CAA GAC AAA CAA GCG ATT GTT GCT GAA GTC AGC GAA GTA GGC AAA GGC GCG CTG TCT GCA GTA
S.typhimurium -----

E.coli      M A L N L Q D K Q A I V A E V S E V A R G A L S A V
S.typhimurium -----

GTT GCG GAT TCC CGT GGC GTA ACT GTA GAT AAA ATG ACT GAA CTG CGT AAA GCA GGT CGC GAA GCT GGC GTA TAC ATG CGT GTT GTT CGT
-----
30 40 50
V A D S R G V T V D E M T E L R K A G R E A G V T K R V V R
-----
AAC ACC CTG CTG CGC CGT GCT GAA GGT ACT CCG TTC GAG TGC CTG AAA GAC GCG TTT GTT GGT CCG ACC CTG ATT GCA TAC TCT ATG
-----C-TC-----A-----A-----
60 70 80
M T L L R R A V E G T P F E C L E D A F V G P T E I A V S M
-----V-----Q-----T-----

GAA CAC CCG GGC GCT GCT GCT CGT CTG TTC AAA GAG TTC GCG AAA GCG AAT GCA AAA TTT GAG GTC AAA GCC GGT GCC TTT GAA GGT GAG
-----T--A-----
90 100 110
E H P G A A A R L F K E F A K A M A E P G V E A A A P E G E
-----

CTG ATC CCG GCG TCT CAG ATC GAC CGC CTG GCA ACT CTG CCG ACC TAC GAA GAA GCA ATT GCA CGC CTG ATG GCA ACC ATG AAA GAA GCT
-----
120 130 140
L I P A S Q I D E L A T L P T Y E E A I A R L N A T M K Z A
-----

TCG GCT GGC AAA CTG GTT CGT ACT CTG GCT GCT GTA CGC GAT GCG AAA GAA GCT GCT TAA TCGCAGTATCTTTTAAACGCATTCGCTTACGATATAAC
-----C-A-----A-----G-----G-----A-C-A-----T-----
150 160
S A G K L V V T L A A V R D A K E A A ***
-----
***

```

Рис.4. Порівняння нуклеотидної послідовності гену *gplJ* та дедукованої а.к. послідовності білку L10 *E.coli* (Post J. et al., 1979) та *S.typhimurium*.

регуляторної здатності білків L10 сконструювали із збереженням певної лідерної послідовності. Конструювання pAZ102 та плазмід, використаних для котрансформації в pAZ102, схематично зображені на рис.5. Плазміда pEP20 кодує синтез нативного біл-

ка L10 E.coli, рЕР15 кодує синтез білка L10 E.coli з делецією 20 С-кінцевих амінокислотних залишків, а рЕР22 направляє синтез білка L10 E.coli з мутацією  $Lys_{143}Glu_{144} \rightarrow Gln$ , тоді як плазміда рМw12 кодує нативний білок L10 S.typhimurium. Показано, що білкові L10, кодованому плазмідом рЕР22, не притаманна регуляторна здатність (Патон Е.В., 1989), тому дану плазмиду використали як контроль. Вплив різних білків L10 на експресію репортерного гену оцінювали за активністю кодованої  $\beta$ -галактозидази, яку вимірювали за методом Міллера.

Як показало порівняння (таблиця 2), найбільший гальмівний вплив притаманий нативному L10 E.coli, що кодується плазмідом рЕР20. Регуляторна активність білку L10 E.coli з делецією 20 С-кінцевих амінокислотних залишків була нижчою, ніж у нативного білка L10 E.coli, однак вища, ніж у нативного білка L10 S.typhimurium. Дуже цікаво, що присутність контрольної плазміди рЕР22 (без регуляторної активності) підвищувала рівень експресії репортерного гену. Найбільш ймовірним поясненням цього може бути інтерференція мутантного білку L10 з гомологічним білком, що міститься в клітині. Логічно вважати, що нативний L10, кодований хромосомним геном клітини-хаваяна, дещо пригнічує експресію репортерного гену. Показано, що комплекс з L7/L12 стабілізує L10, збільшуючи його регуляторну здатність (Petersen С., 1990). Для комплексоутворення з L7/L12 необхідний С-кінець, збережений у білка, кодованого рЕР22. Мутантний білок L10, синтезований у великій кількості з рЕР22, очевидно, відтитровує L7/L12 в комплексу з нативним білком і в такий спосіб знижує стабільність останнього та його інгібуючий вплив на експресію репортерного гена. Кількісна оцінка показала меншу ефективність L10 S.typhimurium в порівнянні з його аналогом в E.coli. Можливо, що L10 білок S.typhimurium менш спо-

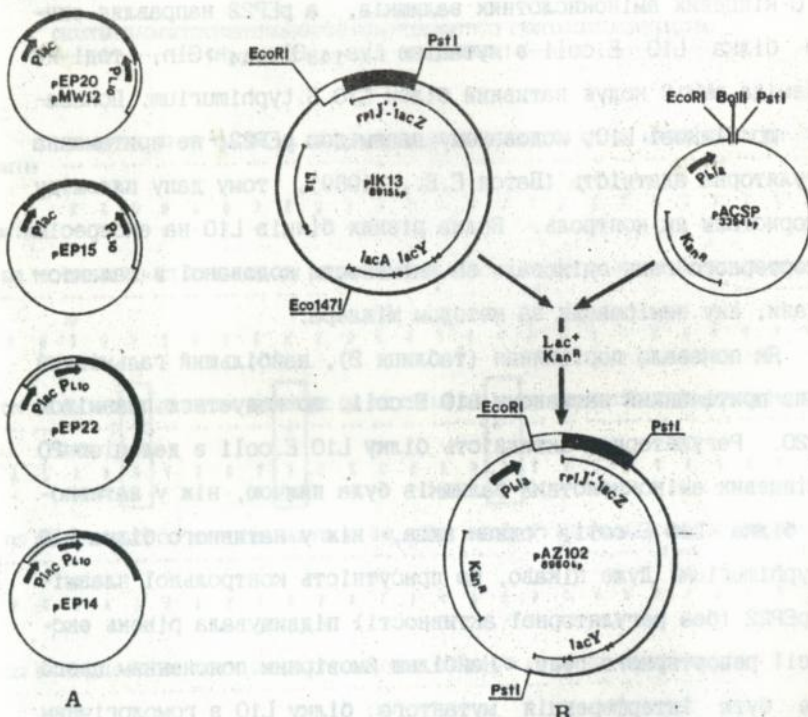


Рис. 5. Схематичне зображення плазмід, використаних для котрансформациї: плазмід з генами *rplJ* (а); схема отримання плазміді рАЗ102 з репортерним геном *rplJ'*-*lacZ* (б).

Таблиця 2.

Порівняння експресії репортерного гену *rplJ'*-*lacZ* в присутності плазмід з генами *rplJ*.

| Плазміді     | Відносна активність<br>$\beta$ -галактозидази, % |
|--------------|--------------------------------------------------|
| pAZ102       | 100.0                                            |
| pAZ102+pEP20 | 33.9                                             |
| pAZ102+pEP15 | 37.9                                             |
| pAZ102+pMW12 | 47.5                                             |
| pAZ102+pEP22 | 111.9                                            |

Примітка, середнє квадратичне відхилення не перевищувало 5%

ріднений а гетерологічним сайтом мішені, який відрізняється за первинною та редукованою вторинною структурою.

#### ВИСНОВКИ

1. Отримано серію рекомбінантних конструкцій, які містять гени *rplA'*JL-*rpoBC* оперону *E.coli* та *S.typhimurium*.

2. Виявлено, що клонування генів *rplJL* *E.coli* та *S.typhimurium* в клітинах *E.coli* супроводжується нестабільністю рекомбінантів.

3. Доведено, що нестабільність цих рекомбінантних конструкцій залежить від експресії гену *rplJ* та визначається її рівнем.

4. Кількісно оцінено рівень стабільності рекомбінантних фагів, що містять кластер генів оперона *rplKALJ* *E.coli*.

5. Визначена первинна структура гену *rplJ* та кодованого ним рибосомного білка L10 *S.typhimurium*.

6. Виявлена можливість білка L10 *S.typhimurium* регулювати експресію генів оперону *rplJL* *E.coli*.

Основні результати дисертації опубліковані у таких роботах:

1. Вудмаска М.И., Живолуп А.Н., Патон Е.Б. Повышение стабильности рекомбинантного фага M13, содержащего гены *rplJL-rpoBC'* *E.coli*, путем снижения экспрессии встроенных генов//Генетика.-1990.-Т.26, №3.-С.557-559.

2. Вудмаска М.И., Патон Е.Б. Клонирование участка *rplJL-rpoBC'* оперона *Escherichia coli* в плаزمидях *pBR322* и *pHSG415*// Докл. АН УССР. Сер.Б.-1987.-№10.-С.58-60.

3. The nucleotide sequence of gene *rplJ* encoding ribosomal protein L10 *Salmonella typhimurium*, E.В. Paton,

S.B.Zolotukhin, M.I.Woodmaska et al.//Nucl.Acids Res. -1990. -v.18.N9.-P.2824.

4. Evidence for the ability of L10 Salmonella typhimurium and Klebsiella pneumoniae to regulate rplJL gene expression in Escherichia coli/ E.B.Paton, M.I.Woodmaska, I.V.Kroupskaya et al.//FEBS Lett. -1990. -v.265. -N1,2. -P. 129-132.

5. Nucleotide sequence of the rplJL operon and the deduced primary structure of the encoded L10 and L7/L12 proteins of Salmonella typhimurium compared to that of Escherichia coli/ A.N.Zhyvoloup, M.I.Woodmaska, I.V.Kroupskaya, E.B.Paton// Nucl.Acids Res.-1990.- v.18. N15.-P.4620.

6. Сравнение in vivo регуляторной способности рибосомных белков L10 с различной первичной структурой/ А.Н.Живолуп, И.В.Крупская, М.И.Вудмаска, Е.В.Патон/Виополимеры и клетка.-1992.-т.8.-№3.-С.39-42.

Studies of the factors influencing on the stability of the recombinants containing enterobacterial Rif-operon genes.

Conclusions of PhD thesis.

1. A series of recombinant DNAs construction containing rplA'JL-rpoBC' operon of E.coli and S.typhimurium has been obtained.

2. The cloned rplJL genes have been detected to form unstable recombinants being cloned in E.coli cells.

3. The recombinants instability has been shown to be the result of rplJ expression and to be determined by its level.

4. The stability level of recombinant phages carrying the cluster of E.coli rplA'JL operon has been quantitatively estimated.

5. The primary structure of S.typhimurium rplJ gene and L10 protein coded by this gene have been sequenced.

6. The ability of S.typhimurium L10 protein to regulate the expression of E.coli rplJL operon genes has been detected.



0.1 1984-100 10 18x06 1-12 100  
100 100 100 100 100 100 100 100 100 100



310 88 at

468484

AB 33.517