

УДК 577.218

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКОВ L11-ОПЕРОНА ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И L1-ОПЕРОНА АРХЕЙ

© 2021 А.О. Михайлина^{1*}, Е.Ю. Никонова¹, О.С. Костарева¹,
В. Пиндл², М. Эрлахер³, С.В. Тищенко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук, 142290 Пущино, Россия; электронная почта: alisamikhaylina15@gmail.com

² Медицинский университет Инсбрука, Институт медицинской химии и биохимии, 6020 Инсбрук, Австрия

³ Медицинский университет Инсбрука, Институт геномики и РНКомики, 6020 Инсбрук, Австрия

Поступила в редакцию 15.10.2020

После доработки 24.01.2021

Принята к публикации 24.01.2021

Рибосомный белок L1 – консервативный двухдоменный белок, участвующий в формировании L1-выступа большой рибосомной субчастицы. В условиях дефицита 23S рибосомной РНК белок ингибирует собственную трансляцию, связываясь со специфическим участком в последовательности мРНК своего оперона (L11-оперона бактерий и L1-оперона архей). В работе продемонстрирована консервативность регуляторных свойств рибосомного белка L1 и его домена I в термофильных бактериях родов *Thermus* и *Thermotoga* и в галофильной архее *Haloarcula marismortui*. Наряду с этим, выявлены особенности регуляции оперона в термофильных бактериях, предполагающие наличие двух регуляторных участков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регуляция экспрессии, L11-оперон, L1-оперон, р-белки, мРНК.

DOI: 10.31857/S0320972521040023

ВВЕДЕНИЕ

Рибосомный белок L1 участвует в формировании L1-выступа большой рибосомной субчастицы и является регулятором синтеза белков своего оперона. Белок L1 связывается со специфическим сайтом на собственной мРНК и ингибирует трансляцию всех цистронов рибосомных белков оперона. Детально изучена регуляция L11-оперона бактерии *Escherichia coli* (включающего гены рибосомных белков L1 и L11) [1] и L1-оперона архей рода *Methanococcus* (включающего гены рибосомных белков L1, L10 и L12) [2]. Участок связывания L1 на мРНК *E. coli* располагается в лидерной последовательности мРНК белка L11 [3], а у архей рода *Methanococcus* – в начале кодирующей последовательности гена белка L1 (между 29-м и 67-м нуклеотидами) [4]. L1-связывающие участки мРНК имеют высокую гомологию с участком связывания этого белка на 23S рРНК – как первичной, так и вторичной структуры.

Тем не менее чёткого подтверждения регуляторных свойств рибосомного белка L1 (р-белка) в других бактериях и археях на сегодняшний день не существует. Биоинформатический анализ L11-оперонов продемонстрировал наличие потенциальных регуляторных сайтов перед геном белка L11 (у *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Thermotoga* и *Tenericutes*) и L1 (у *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* и *Chloroflexi*); а в 40% геномов типа *Firmicutes* обнаружены два потенциальных L1-связывающих участка – перед генами белков L11 и L1 [5]. Ранее мы локализовали участки связывания белка L1 на мРНК L11-оперонов *Thermus thermophilus* и *Thermotoga maritima*, определив константы диссоциации комплексов L1–мРНК [6]. В данной статье мы демонстрируем наличие двух L1-связывающих участков на мРНК L11-оперонов исследуемых термофильных бактерий, используя систему транскрипции-трансляции *in vitro*.

В галофильных археях ген белка L1 котранскрибируется с генами белков L10 и L12. Анализ последовательностей L1-оперона выявил предположительный участок связывания белка L1 в нетранслируемой области гена белка L1 [7], однако исследование возможности связывания этого участка с белком и регуляции синтеза белков оперона не проводилось. В данной работе мы определили L1-связывающий участок на

Принятые сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; БСА – бычий сывороточный альбумин; р-белки – рибосомные белки; SD – последовательность Шайна–Дальгарно; SPR – поверхностный плазмонный резонанс.

* Адресат для корреспонденции.

мРНК L1-оперона *Haloarcula marismortui* и показали регуляторные свойства р-белка L1 из этого организма.

Структурно-кинетический анализ комплексов L1–РНК [8] показал, что ведущую роль в этих взаимодействиях играет белковый домен I. Ранее было показано, что домен I белка L1 *T. thermophilus* (TthL1dI) обладает регуляторными свойствами полноразмерного белка, ингибируя синтез архейного белка L1 *Methanococcus vannielii in vitro* [9]. В данной работе демонстрируется консервативность взаимодействий белка L1 с мРНК, поскольку домены I р-белков L1 *T. thermophilus*, *T. maritima* и *H. marismortui* обладают регуляторными свойствами полноразмерных белков L1 в системе *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение генетических конструкций, несущих гены полноразмерного белка L1 и его домена I *H. marismortui* (HmaL1, HmaL1dI). Для получения белков HmaL1 и HmaL1dI были созданы экспрессионные векторы на основе рЕТ-11а (рЕТ-11а_HmaL1 и рЕТ-11а_HmaL1dI). В соответствии с известной нуклеотидной последовательностью, кодирующей HmaL1, были синтезированы праймеры («Евроген», Россия) (табл. 1), содержащие последовательности для расщепления сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции FauNDI и BamHI, необходимые для вставки гена в экспрессионный вектор рЕТ-11а. В качестве матрицы для получения полноразмерного белка была использована геномная ДНК *H. marismortui*.

Домен II белка L1 является вставкой в домен I. Ген домена I получен с помощью метода перекрывающихся участков с использованием 4-х праймеров и 3-х ПЦР (полимеразная цепная реакция). Праймеры Р1 и Р3 (табл. 1) были использованы для амплификации фрагмента ДНК, содержащего участок до вырезаемого домена II и фрагмент после него. Пара праймеров Р2 и Р4 (табл. 1) была использована во второй ПЦР для амплификации фрагмента ДНК, содержащего участок после вырезаемого домена и фрагмента до него. В качестве матрицы для ПЦР была использована плазмида рЕТ-11а, несущая ген белка HmaL1. Таким образом, оба амплифицированных фрагмента содержали перекрывающиеся участки. Эти фрагменты смешивали, денатурировали и отжигали друг на друга для получения гетеродуплекса, который затем использовали в третьей ПЦР для амплификации в полноразмерный фрагмент с помощью двух праймеров к гену *rplA* (прямого Р1 и обратного Р2).

Генетические конструкции TthL1, TthL1dI, TmaL1 и TmaL1dI были получены в нашей лаборатории ранее [6, 8].

Создание генетических конструкций, несущих фрагменты L11-оперона *T. maritima*, *T. thermophilus* и L1-оперона *H. marismortui*. В качестве матриц в сопряженной системе транскрипции-трансляции *E. coli* были использованы плазмиды на основе вектора рUC18, содержащие фрагменты L11-оперона *T. maritima*, *T. thermophilus* и L1-оперона *H. marismortui* под контролем T7-промотора. Плазмиды рTmaL11-L1(-50) и рTthL11-L1(-46) содержали гены белков L11 и L1, а также 50 или 46 нуклеотидов (н.) 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) L11-оперона *T. maritima* и *T. thermophilus* соответственно. Плазмида рHmaL1-L10(-74) содержала гены белков HmaL1 и HmaL10 и 74 нуклеотида 5'-НТО L1-оперона *H. marismortui* (рис. 1).

Для отдельного исследования двух L1-регуляторных участков мРНК *T. maritima* и *T. thermophilus* были получены укороченные конструкции. Плазмиды рTthL1(-100) и рTmaL1(-25) содержали только ген белка L1 и последние 100 или 25 нуклеотидов белка L11 (рис. 1). При использовании в качестве матрицы укороченной конструкции, содержащей ген белка TthL1 и последние 100 н. гена белка TthL11, включая область перекрывания открытых рамок считывания генов белков TthL11 и TthL1 (рTthL1(-100)), в сопряженной системе транскрипции-трансляции белок L1 не синтезировался (данные не представлены). По всей видимости, в *T. thermophilus* перед геном белка L1 нет собственной последовательности SD, а его трансляция сопряжена с трансляцией белка L11. Для того чтобы оценить способность белка TthL1 регулировать свой синтез при взаимодействии с участком мРНК в области перекрывания генов р-белков L11 и L1, мы добавили к 5'-концу укороченной конструкции рTthL1(-100) участок, содержащий последовательность SD (рис. 1). Плазмиды рTmaL11(-50) и рTthL11(-46) содержали только ген белка L11 и 50/46 нуклеотидов 5'-НТО *T. maritima* и *T. thermophilus* соответственно (рис. 1).

Согласно известной нуклеотидной последовательности L11-оперона *T. maritima*, *T. thermophilus* и L1-оперона *H. marismortui*, были синтезированы праймеры («Евроген», Россия) (табл. 1), несущие сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции, необходимые для вставки гена в экспрессионный вектор рUC18. Прямой праймер содержал последовательность промотора для РНК-полимеразы фага T7 (табл. 1). На рисунке 1 представлены схемы полученных конструкций фрагментов L11-оперона и L1-оперона.

Таблица 1. Последовательности использованных праймеров

Фрагмент гена	Прямой праймер, 5'→3'	Обратный праймер, 5'→3'
HmaL1	P1 FauNDI GGAATCCATATGCGAGATCAGGAA	P2 BamHI CGCGGATCCTCAGGCAACCTCCATCGCA
HmaL1dI	P1 P4 CGGTGAGGTCATCGAAGGTCCGCACG	P3 CGGTACCGGTGCCAGCAGG P2
pTthL11-L1(-46)	P5 XbaI AGGTCGACTCTAGAAATACGACTCACTATAG- AGGCCTAGAGGCGTTTGCA	P6 EcoRI ATGATTACGAATTCCTTAGGAGTGGGGGTTGAT- GCGCA
pTthL11(-46)	P5	P7 EcoRI ATCTAGGAATTCCTTAGATCTCCAGGACCTGCTC
pTthL1(-100)	P8 XbaI AGGTCGACTCTAGAAATACGACTCACTATAG- GAAGGAGATATACATATGGTGGTGGGC- GCTCCGGAGGTGAAGG	P7
pTmaL11-L1(-50)	P9 HindIII CTACTGCAAAGCTTAATACGACTCACTATAG- TGAGAAAACGTGGGAGGAGGA	P10 XmaI ATCTAGCCCGGGTTACTCTTTCAACAGACTCT- GAA
pTmaL11(-50)	P9	P10 XmaI ATCTAGCCCGGGTTACAAGCTGTTTTCGTTTC- AAATC
pTmaL1(-25)	P11 HindIII CTACTGCAAAGCTTAATACGACTCACTATAG- ATGCGGAAAGGAGGA	P9
pHmaL1-L10(-74)	P12 HindIII CTACTGCAAAGCTTAATACGACTCACTATAG- CTACTCGCACGAGACAGGCATC	P13 EcoRI ATGATTACGAATTCCTTACTGAATGCGTGCCTC- GGCACC

Примечание. Праймеры были использованы для клонирования генов белков HmaL1 и HmaL1dI и фрагментов L11-оперона *T. maritima*, *T. thermophilus* и L1-оперона *H. marismortui*. Сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты, серым выделена последовательность T7-промотора, рамкой выделен добавленный участок, содержащий последовательность Шайна–Дальгарно (SD).

Выделение белков L1 и L1dI. Получение белков TthL1, TthL1dI, TmaL1 и TmaL1dI описано ранее [6, 8]. Для получения штаммов-суперпродукторов белка L1 *H. marismortui* и его домена I была использована система Штудиера [10]. Поскольку ген белка HmaL1 содержит редкие в *E. coli* кодоны для Gly, Arg и Ile, клетки штамма BL21(DE3) предварительно трансформировали плазмидой pRARE, которая несет гены tРНК, узнающие редкие кодоны (AGG/AGA (Arg), CGG (Arg), AUA (Ile), CUA (Leu), CCC (Pro),

GGA (Gly)) [11]. Штамм *E. coli* BL21 (DE3) pRARE трансформировали плазмидой pET-11a, содержащей ген белка HmaL1 или HmaL1dI. Несколько колоний высевали в жидкую среду LB (абб. от англ. lysogeny broth) (100 мкг/мкл ампицилина и 35 мкг/мкл хлорамфеникола) и культивировали в течение ночи при 37 °С. Затем клетки пересевали в 500 мл среды LB и культивировали при температуре 37 °С до получения оптической плотности $A_{590} \approx 0,6$ о.е., после чего к клеткам добавляли индуктор IPTG (изопро-

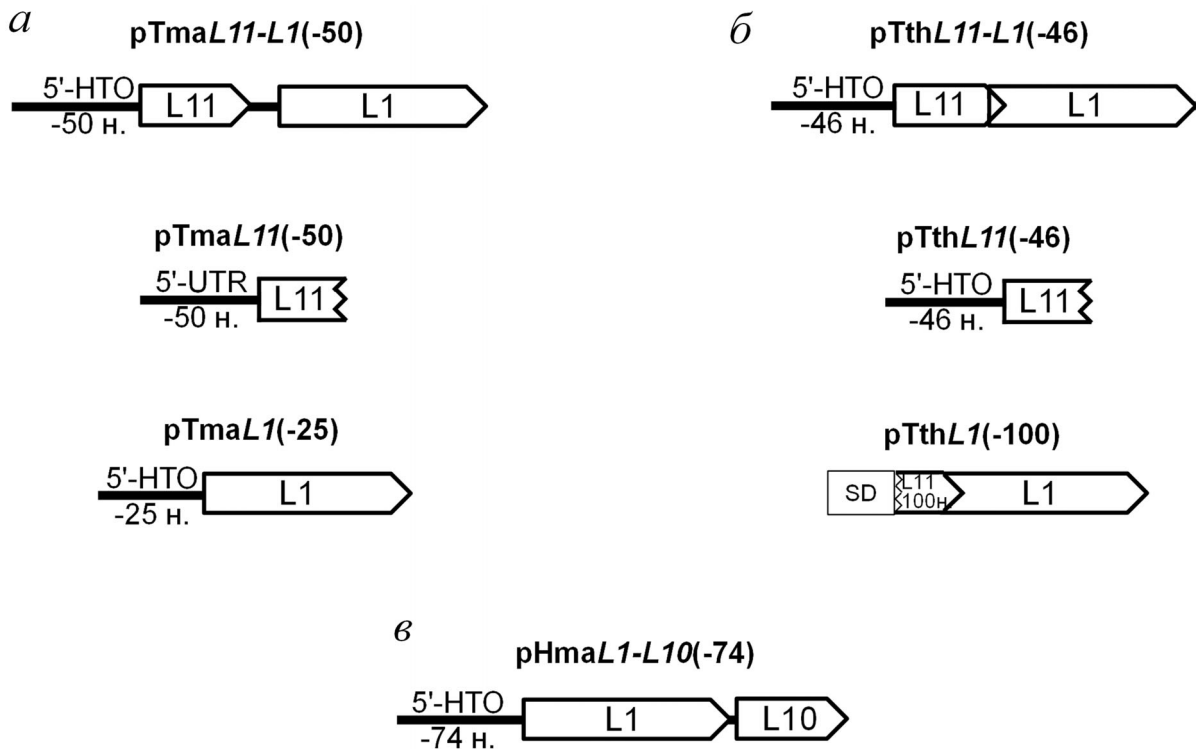


Рис. 1. Схемы генетических конструкций фрагментов L11-оперона *T. maritima* (а), *T. thermophilus* (б) и L1-оперона *H. marismortui* (в), использованных в качестве матриц в сопряженной системе транскрипции-трансляции *E. coli in vitro*: pTmaL11-L1(-50) и pTthL11-L1(-46) – гены белков L11 и L1, и 50/46 н. 5'-НТО перед геном белка L11; pTmaL11(-50) и pTthL11(-46) – фрагмент гена белка L11 и 50/46 н. 5'-НТО перед ним; pTmaL1(-25) – ген белка TmaL1 и 25 н. 5'-НТО перед ним; pTthL1(-100) – ген белка TthL1, последние 100 н. гена белка TthL11, включая область перекрывания открытых рамок считывания генов белков TthL11 и TthL1, и последовательность SD; pHmaL1-L10(-74) – гены белков HmaL1 и HmaL10 и 74 н. 5'-НТО перед геном белка HmaL1

пил-β-D-1-тиогаллактопиранозид) до конечной концентрации 0,5 мМ. После добавления индуктора клетки продолжали инкубировать в тех же условиях в течение 3 ч. Затем их осаждали низкоскоростным центрифугированием (8 000 g, 15 мин, 4 °С) и ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl, 2 М KCl, 50 мМ MgCl₂, 5 мМ β-МЭ, 1 мМ ЭДТА-Na₂, 0,1 мМ РМSEF, pH 7,5 при 25 °С. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonic Dismembrator 550 («Fisher Scientific», США). Затем центрифугированием последовательно осаждали клеточный дебрис (14 000 g, 30 мин, 4 °С) и рибосомы (90 000 g, 1 ч, 4 °С).

К безрибосомному лизату добавляли сульфат аммония и KCl до конечной концентрации 1,5 и 3 М соответственно. Образец наносили на колонку с носителем бутил-сефароза («GE Healthcare», США), уравновешенную со стартовым буфером (50 мМ Tris-HCl, 3 М KCl, 1,5 М (NH₄)₂SO₄, pH 7,5 при 25 °С). Элюирование белков проводили обратным линейным градиентом концентрации (NH₄)₂SO₄ от 1,5 М до 0 М в стартовом буфере.

Препарат белка HmaL1 (или HmaL1dI) диализовали против буфера (50 мМ Tris-HCl, 3 М KCl, pH 7,5 при 25 °С) и дополнительно очищали Superdex 75. Чистоту белковых препаратов оценивали при помощи Ds-Na-ПААГ-электрофореза [12].

Фрагменты мРНК *T. thermophilus*, *T. maritima*, *H. marismortui* и РНК *H. marismortui*. Для кинетических исследований мы использовали полученные синтетически («Синтол», Россия) модифицированные биотином фрагменты мРНК L11-оперона *T. thermophilus* и *T. maritima*, L1-оперона *H. marismortui*, содержащие потенциальные регуляторные участки, а также специфический фрагмент 23S рРНК *H. marismortui*, содержащий три спирали (Н76, Н77, Н78) [13]. Биотин располагался на 3'-конце фрагментов мРНК.

Кинетический анализ взаимодействия белка L1 и его домена I *T. thermophilus*, *T. maritima* и *H. marismortui* со специфическими фрагментами мРНК и рРНК методом SPR. Кинетический анализ взаимодействия белков со специфическими фрагментами РНК проводили с помощью поверх-

ностного плазмонного резонанса (SPR – surface plasmon resonance) [14] на системе ProteOn XPR36 («Bio-Rad», США). Биотинилированные фрагменты РНК наносили на сенсорные чипы NLC («Bio-Rad», США) с иммобилизованным авидином [15].

Серии разведений из пяти концентраций аналита (L1 или L1d1) готовили в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, 175 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0,05% Tween-20, рН 7,5 при 25 °С. Скорость протока составляла 30 мкл/мин, время ассоциации – 300 сек, время диссоциации – 700–1200 сек. Все эксперименты по связыванию проводили при температуре 25 °С.

Набор из 3–5 сенсограмм обсчитывали в программе VIAEvaluation («Biacore», США) с использованием модели Ленгмюра (1 : 1) или двухстадийной реакции.

Анализ ингибирования синтеза белков L11-оперона *T. thermophilus*, *T. maritima* и L1-оперона *H. marismortui* в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro*. Для экспериментов в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* использовали набор PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit («New England Biolabs», Германия). Матрицами служили плазмиды, несущие фрагменты L11-оперона *T. thermophilus*, *T. maritima* или L1-оперона *H. marismortui* под контролем T7-промотора (рис. 1). В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду, несущую ген р-белка L3 из *M. jannaschii* (MjaL3). Реакцию проводили согласно рекомендации производителя в присутствии L-[³⁵S]метионина в концентрации 11 мКи/мл («PerkinElmer», США). Для ингибирования синтеза белков с плазмиды в реакционную смесь добавляли белок L1 или его домен I (0–20 мкМ). В качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) в тех же количествах. Для опытов по конкуренции в смесь добавляли специфический для белка L1 фрагмент 23S рРНК до 20 мкМ. Реакцию проводили при 37 °С в течение 1 ч, после чего к смеси добавляли буфер для Ds-Na-ПААГ-электрофореза и наносили на полиакриламидный гель.

Анализ способности белка L1 ингибировать *in vitro* синтез мРНК L11-оперона *T. thermophilus* и *T. maritima*, а также L1-оперона *H. marismortui*. Фрагменты мРНК были получены методом транскрипции *in vitro* с использованием РНК-полимеразы фага T7, как в отсутствие р-белка L1, так и в присутствии его 20 мкМ. В качестве матрицы использовали плазмиды рTthL11(-46), рTmaL11(-50) и рHmaL1-L10(-74), линеаризованные с помощью эндонуклеаз рестрикции EcoRI, XmaI и EcoRI соответственно (табл. 1, рис. 1). Плазмиды содержали гены,

кодирующие мРНК соответствующих оперонов, под контролем T7-промотора. Анализ транскриптов проводили с помощью электрофореза в 5%-ном ПААГ (19 : 1) в присутствии 8 М мочевины и электродного буфера (40 мМ Tris-Ацетат, 0,2 мМ ЭДТА-Na₂, рН 8,0 при 25 °С).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фрагменты мРНК L11-оперона *T. thermophilus*, *T. maritima* и L1-оперона *H. marismortui*, содержащие L1-связывающие детерминанты. Ранее мы определили, что в *T. maritima* имеется два потенциальных участка связывания белка L1 на мРНК L11-оперона [6]. Первый участок расположен в лидерной последовательности мРНК белка L11 (mRNA_{TmaL11}), второй участок включает лидерный и кодирующий участки мРНК белка L1 (mRNA_{TmaL1}) (рис. 2, а). В *T. thermophilus* мы обнаружили лишь один потенциальный участок связывания белка L1, который расположен между кодирующими частями мРНК белков TthL11 и TthL1 (mRNA_{TthL1}) (рис. 2, б). Мы получили соответствующие фрагменты мРНК и определили сродство TthL1 и TmaL1 к этим фрагментам методом SPR [6]. Оказалось, что при взаимодействии белка L1 с этими фрагментами мРНК, образуются стабильные комплексы TthL1–mRNA_{TthL1} и TmaL1–mRNA_{TmaL11}, однако комплекс TmaL1–mRNA_{TmaL1} не формируется. Несмотря на то, что все основные детерминанты для РНК-белкового взаимодействия были сохранены, фрагмент mRNA_{TmaL1} не содержал нуклеотид C₊₁₇, который, согласно данным о структуре комплекса TthL1–mRNA, способен образовывать две закрытые от растворителя водородные связи с белком L1, которые ранее считались несущественными для РНК-белкового взаимодействия [16]. Мы получили удлиненный на 2 пары нуклеотидов фрагмент mRNA_{TmaL1} (рис. 2, а) и показали, что он образует стабильный комплекс с белком L1.

Детальный анализ геномной последовательности L11-оперона *T. thermophilus* на основе гомологии со структурно-консервативным L1-связывающим модулем [17] позволил обнаружить второй предположительный участок связывания белка L1 на мРНК L11-оперона *T. thermophilus*, который оказался расположен перед геном белка L11 (mRNA_{TthL11}) (рис. 2, б). Взаимодействие с этим фрагментом мРНК также было исследовано.

Опероны, регулируемые белком L1 в археях, отличаются от бактериальных. В *H. marismortui* ген белка L1 котранскрибируется с генами бел-

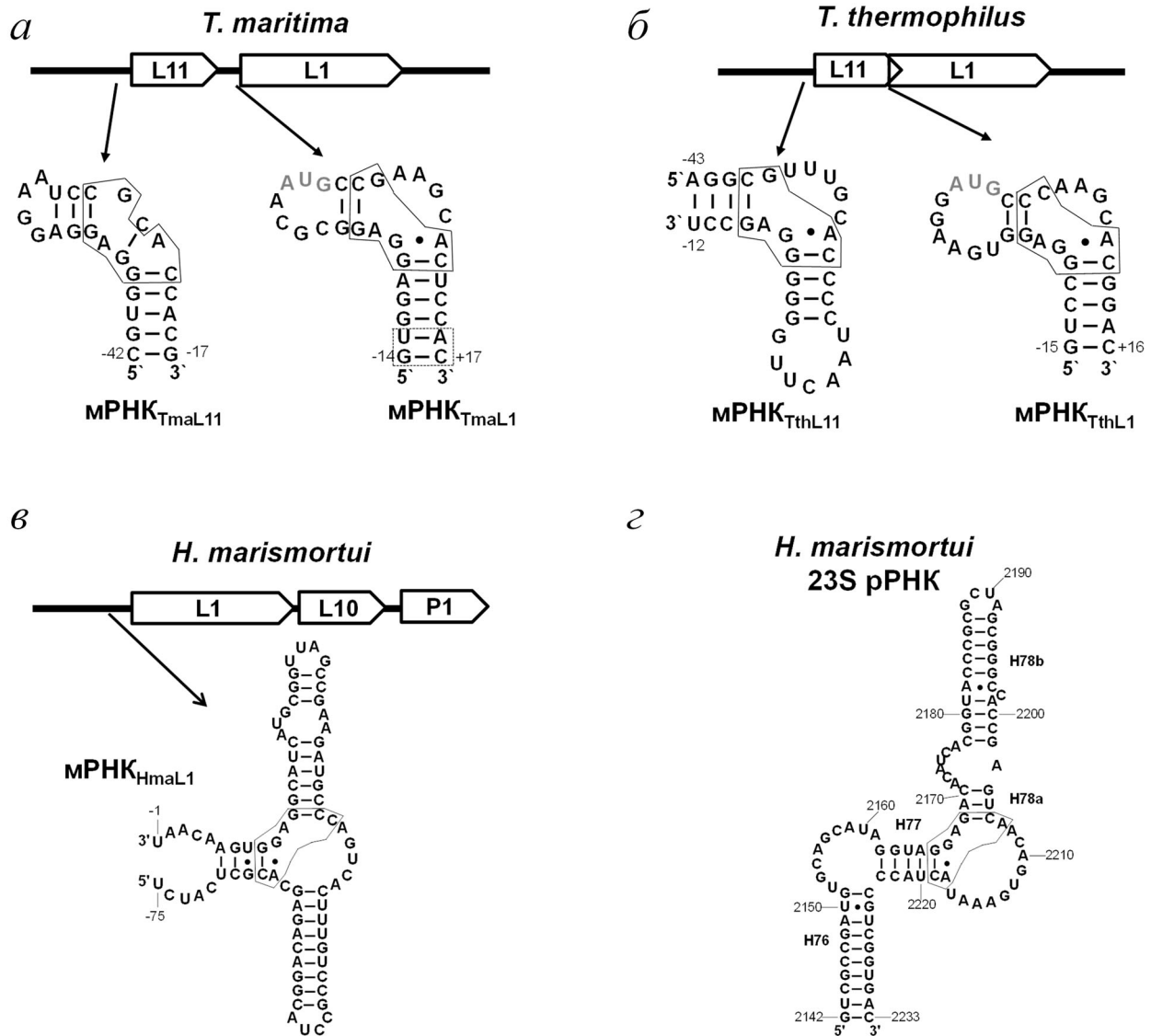


Рис. 2. а – Организация генов в L11-опероне *T. maritima*. Пунктирной рамкой на фрагменте mRNA_{TmaL1} выделены добавленные пары нуклеотидов. Нуклеотиды 5'-НТО соответствующего гена обозначены знаком (-), нуклеотиды смысловой части мРНК обозначены знаком (+); б – организация генов в L11-опероне *T. thermophilus*; в – организация генов в L1-опероне *H. marismortui*; г – вторичная структура специфического фрагмента 23S рРНК *H. marismortui*. Также на рисунке представлены предположительные вторичные структуры фрагментов мРНК, с которыми может взаимодействовать р-белок L1. Стрелками показано положение L1-связывающих участков на соответствующей полицистронной мРНК. На фрагментах мРНК в рамке выделены нуклеотиды, образующие консервативные контакты с белком L1, серым показан старт-кодон

ков L10 и L12. В лидерной последовательности мРНК белка L1 *H. marismortui* находится участок, гомологичный консервативному сайту связывания данного белка на мРНК, также схожий с сайтом связывания белка HmaL1 на 23S рРНК *H. marismortui* [13] (рис. 2, в, г).

Анализ взаимодействия белков L1 *T. thermophilus*, *T. maritima* и *H. marismortui*, а также их доменов I со специфическими фрагментами мРНК тех же организмов. Для проверки способности полноразмерных белков TthL1, TmaL1, HmaL1, а также их доменов I взаимодействовать с опре-

деленными участками на мРНК соответствующих оперонов мы получили биотинилированные фрагменты мРНК, содержащие эти предположительные L1-связывающие участки. Методом SPR были определены константы диссоциации (K_D) комплексов TthL1 (TthL1dI), TmaL1 (TmaL1dI), (рис. 3) и HmaL1 (HmaL1dI) (рис. 4) со специфическими фрагментами мРНК (табл. 2).

Оказалось, что сродство TthL1 и TthL1dI к фрагменту мРНК_{TthL11} почти на порядок выше, чем к фрагменту мРНК_{TthL1} (табл. 2). Константы

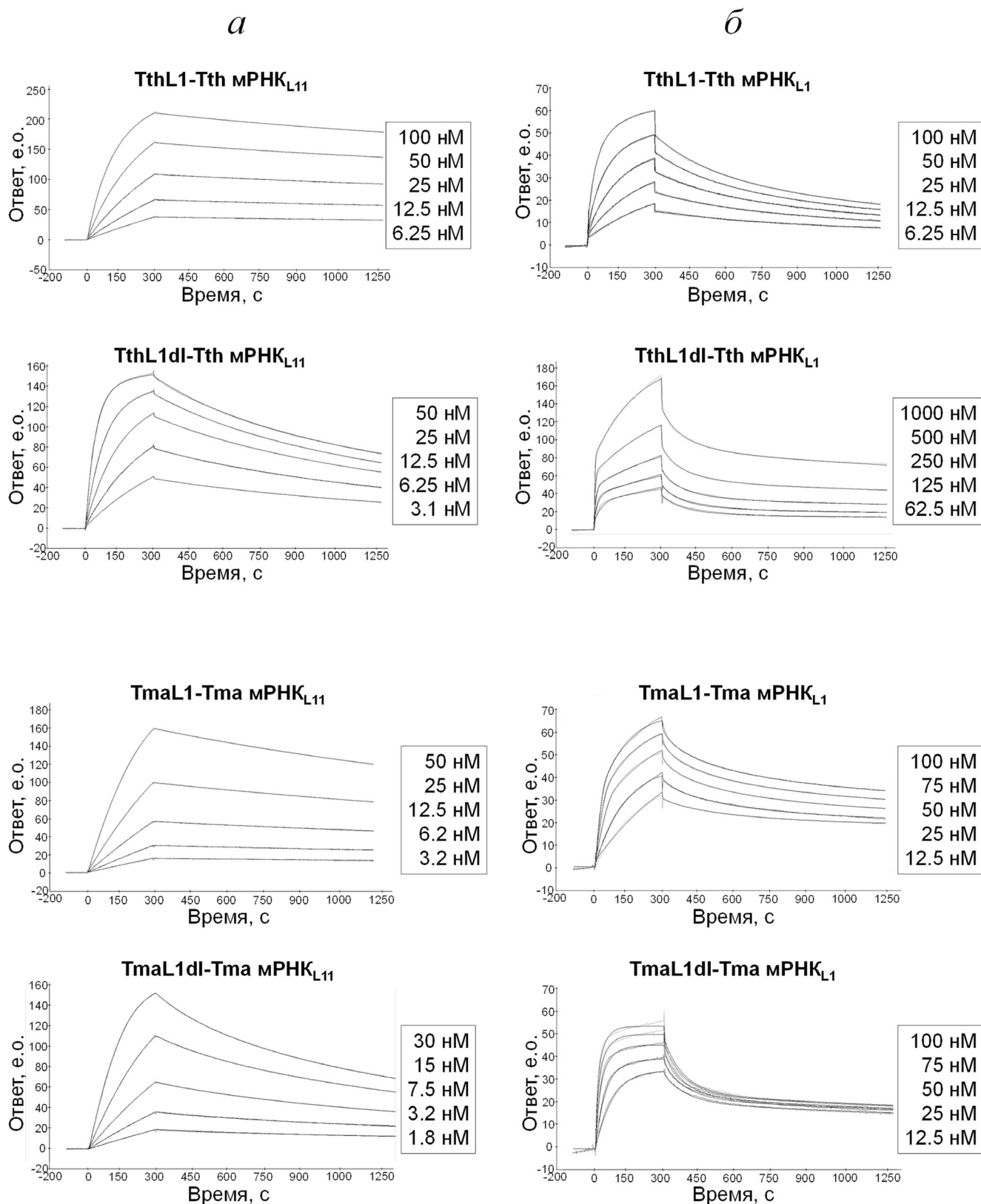


Рис. 3. Сенсограммы кинетического анализа взаимодействия белка L1 и его домена I *T. thermophilus* и *T. maritima* со специфическими фрагментами мРНК. *а* – Соответствующие мРНК_{L11}; *б* – соответствующие мРНК_{L1}. Для каждого набора сенсограмм указаны используемые концентрации аналита. Ровные линии соответствуют теоретической аппроксимации полученных экспериментальных данных с использованием модели Ленгмюра (1 : 1) (*а*) или двухстадийной реакции (*б*)

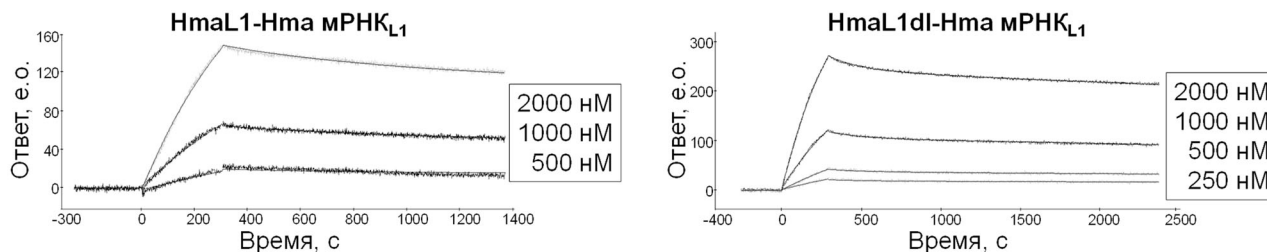


Рис. 4. Сенсограммы кинетического анализа взаимодействия белков HmaL1 и HmaL1dI со специфическими фрагментами мРНК. Для каждого набора сенсограмм указаны используемые концентрации аналита. Ровные линии соответствуют теоретической аппроксимации полученных экспериментальных данных с использованием модели Ленгмюра (1 : 1)

диссоциации (K_D) комплексов белков TmaL1 и TmaL1dI с мРНК_{TmaL1} сравнимы с K_D комплексов белков с мРНК_{TmaL11} (табл. 2). Взаимодействие в комплексах TthL1(TthL1dI) – мРНК_{TthL11} и TmaL1(TmaL1dI) – мРНК_{TmaL11} (рис. 3, а) описывается простой моделью Ленгмюра (1 : 1). Взаимодействие белков со специфическими фрагментами мРНК_{L1} с лучшим приближением ($\chi^2 < 10$) описывается моделью двухстадийной реакции, которая предполагает образование промежуточного комплекса (рис. 3, б).

HmaL1 и HmaL1dI связываются с фрагментом мРНК_{HmaL1}, содержащим предполагаемый регуляторный участок L1-оперона *H. marismortui* (рис. 4, табл. 2). Причем это взаимодействие слабее, чем со специфическим фрагментом 23S рРНК (табл. 2), что согласуется с классическими принципами регуляции синтеза р-белков.

Сродство доменов I к специфическим фрагментам мРНК сравнимо со сродством полно-размерных белков, что позволяет предположить, что как бактериальный, так и архейный домен I белка L1 обладает регуляторными свойствами наряду с полноразмерными белками.

Исследование способности белка L1 регулировать синтез белков своего оперона на уровне транскрипции. Чтобы исключить влияние р-белка L1 исследуемых термофильных бактерий и археи на транскрипцию мРНК своего оперона, мы проанализировали эффективность синтеза мРНК методом транскрипции *in vitro* с помощью РНК-полимеразы T7. Исследование проводили как в присутствии, так и в отсутствие р-белка L1. Анализ мРНК транскриптов показал, что р-белок L1 не оказывает влияния на уровень транскрипции мРНК L11-оперона

Таблица 2. Кинетические параметры взаимодействия белка L1 и его домена I *T. thermophilus*, *T. maritima* и *H. marismortui* со специфическими фрагментами мРНК

Комплекс	$ka_1, (\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$kd_1, (\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$ka_2, (\times 10^{-6} \text{ s}^{-1})$	$kd_2, (\times 10^{-5} \text{ s}^{-1})$	$K_D, (\text{нМ})$
TmaL1–мРНК _{TmaL11}	279	6,4	–	–	2,29
TmaL1dI–мРНК _{TmaL11}	1190	23,5	–	–	1,97
TmaL1–мРНК _{TmaL1}	272	0,1	738	10,8	3,78
TmaL1dI–мРНК _{TmaL1}	986	22,3	456	78	2,26
TthL1–мРНК _{TthL11}	137	2,67	–	–	1,93
TthL1dI–мРНК _{TthL11}	810	13	–	–	1,60
TthL1–мРНК _{TthL1}	33	4,7	1,14	9,65	14,24
TthL1dI–мРНК _{TthL1}	5,88	3,87	43	248	65,82
HmaL1–мРНК _{HmaL1}	0,98	4,09	–	–	417
HmaL1dI–мРНК _{HmaL1}	0,64	5,44	–	–	850
HmaL1–рРНК	1,16	0,53	–	–	45,6
HmaL1dI–рРНК	2,5	1,7	–	–	71,2

Примечание. $K_D = kd_1/ka_1$; ka_1 – константа скорости ассоциации первой стадии реакции; kd_1 – константа скорости диссоциации первой стадии реакции; K_D – кажущаяся константа диссоциации; ka_2 и kd_2 – константы скорости ассоциации и диссоциации второй стадии реакции соответственно.

T. thermophilus и *T. maritima*, а также L1-оперона *H. marismortui* (рис. 5).

Таким образом, мы показали, что исследуемые белки не регулируют синтез белков своего оперона на уровне транскрипции.

Анализ регуляторных свойств рибосомного белка L1 *T. maritima* и *T. thermophilus*. Последующие исследования мы проводили в сопряженной системе транскрипции—трансляции *E. coli in vitro*. В наших экспериментах были использованы матрицы, несущие разные участки L11-оперона *T. thermophilus* и *T. maritima*. Четыре конструкции содержали один из генов белка, L11 или L1, (pTmaL11(-50), pTthL11(-46), pTmaL1(-25) и pTthL1(-100)) (рис. 1); две конструкции содержали гены двух белков, L11 и L1, (pTmaL11-L1(-50) и pTthL11-L1(-46)) (рис. 1). В реакционную смесь добавляли различные количества L1/L1dI *T. thermophilus* или *T. maritima*. Как полноразмерные белки L1, так и их домены I ингибировали синтез белков соответствующих конструкций (рис. 6, 7).

Было выявлено, что добавление в систему белка L1 ингибирует дозозависимым образом синтез обоих белков L11-оперона (L11 и L1), как на мРНК *T. thermophilus*, так и *T. maritima*.

Более того, при добавлении домена I белка L1 также происходит ингибирование синтеза обоих белков (рис. 6). В экспериментах по конкурентному ингибированию добавление специфического фрагмента 23S рРНК *T. thermophilus*, содержащего L1-связывающий участок, ингибирования в обоих случаях (TthL1 и TmaL1) не происходит (рис. 6).

Была проверена эффективность синтеза белков с укороченных конструкций, содержащих только по одному участку связывания белка L1 и одному гену L11-оперона *T. thermophilus* и *T. maritima* в присутствии белка L1. Показано, что как полноразмерный белок, так и его домен I ингибируют синтез белков L11 и L1 с соответствующих конструкций (рис. 7).

Анализ регуляторных свойств рибосомного белка L1 археи *H. marismortui*. Регуляторные свойства белка HmaL1 и его домена I были также исследованы в сопряженной системе транскрипции—трансляции *in vitro* (рис. 8). В качестве матрицы использовали конструкцию, несущую два гена L1-оперона *H. marismortui*, кодирующие белки L1 и L10, и 5'-НТО (74 н.), предположительно, включающую регуляторный участок (pHmaL1-L10(-74), рис. 1, в). При добавле-

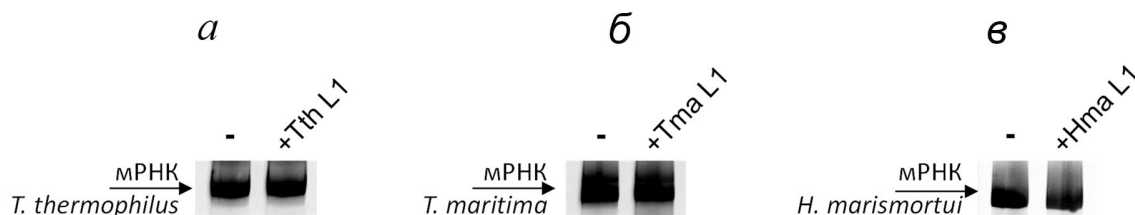


Рис. 5. Электрофоретический анализ транскрипции фрагментов мРНК. В качестве матрицы для транскрипции *in vitro* использовали конструкции, содержащие ген белка L11 и 5'-НТО перед ним термофильных бактерий: а – pTthL11(-46); б – pTmaL11(-50); в – конструкция, содержащая гены белков HmaL1 и HmaL10 и 5'-НТО перед геном белка HmaL1 – pHmaL1-L10(-74)

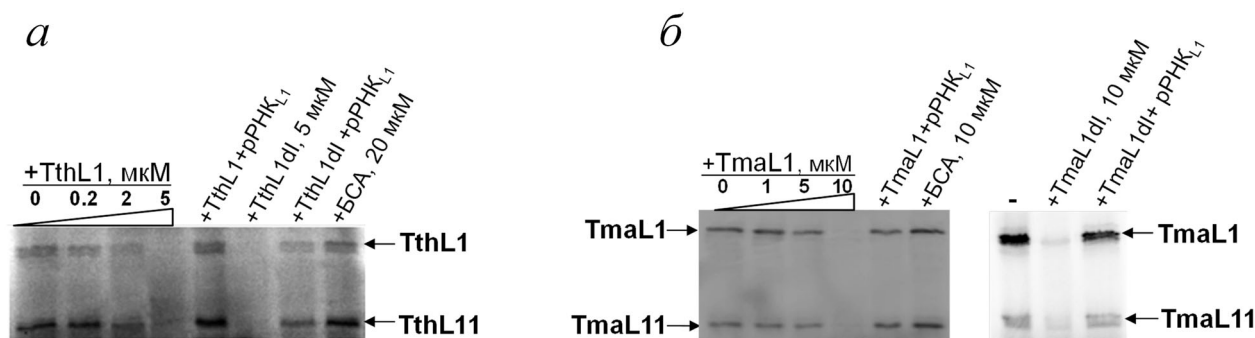


Рис. 6. Авторадиограмма белков L11 и L1 *T. thermophilus* (а) и *T. maritima* (б), синтезированных в присутствии L-[³⁵S]метионина, белка L1 (в различном количестве), его домена I, или БСА. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции—трансляции использовали конструкции, несущие оба гена L11-оперона – *rplK* и *rplA*, кодирующие белки L11 и L1 соответственно, и 5'-НТО (pTmaL11-L1(-50) и pTthL11-L1(-46), рис. 1, а, б)

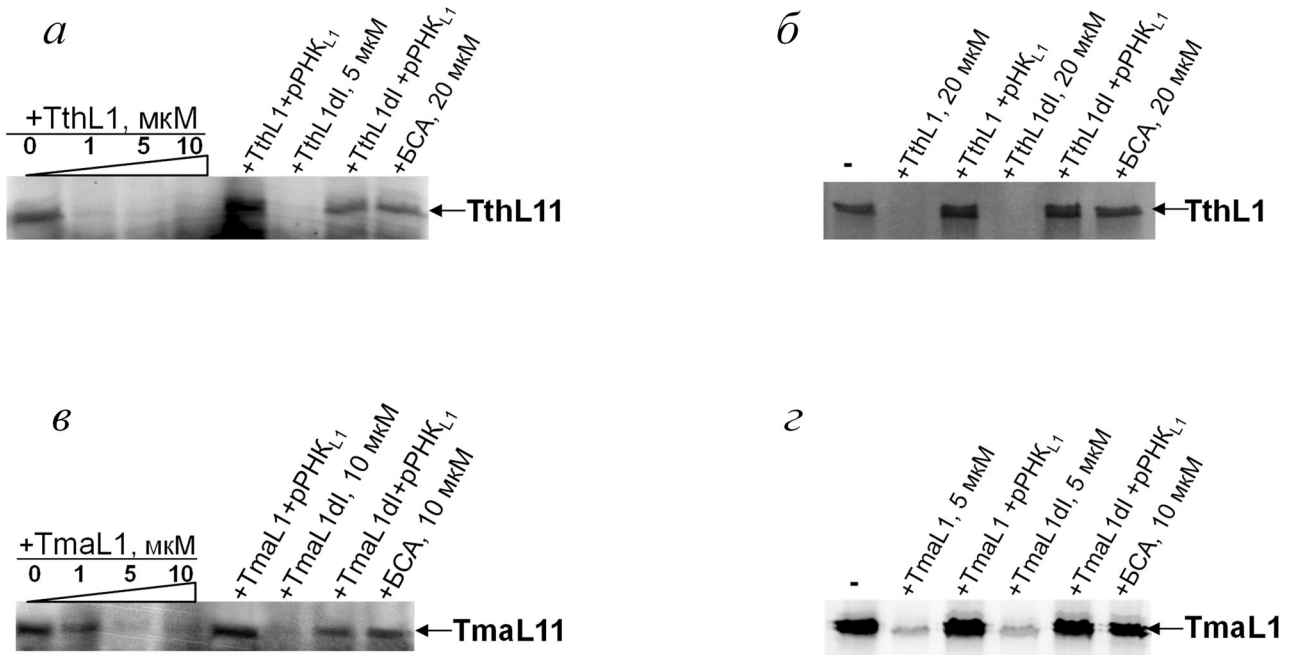


Рис. 7. Авторадиограммы белков L11 *T. thermophilus* и *T. maritima* (а, в) и белков L1 *T. thermophilus* и *T. maritima* (б, г), синтезированных в присутствии L-[³⁵S]метионина и белка L1 (в различной концентрации), его домена I, БСА и фрагмента 23S рРНК *T. thermophilus*, содержащего L1-связывающий участок. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции-трансляции были использованы укороченные конструкции, содержащие только по одному L1-связывающему участку и одному гену L11-оперона: а, в – ген белка L11 и участок 5'-НТО перед ним (рTmaL11(-50), рTthL11(-46), рис. 1); б, г – ген белка L1 и участок перед ним (рTmaL1(-25) и рTthL1(-100), рис. 1)

нии в систему как белка HmaL1, так и HmaL1dI, дозозависимым образом ингибируется синтез обоих белков (L1 и L10) (рис. 8). В экспериментах по конкурентному ингибированию в обоих случаях добавление специфического фрагмента 23S рРНК *H. marismortui* (рис. 2, г), содержащего L1-связывающий участок, ингибирующий эффект HmaL1 или HmaL1dI отсутствует (рис. 8).

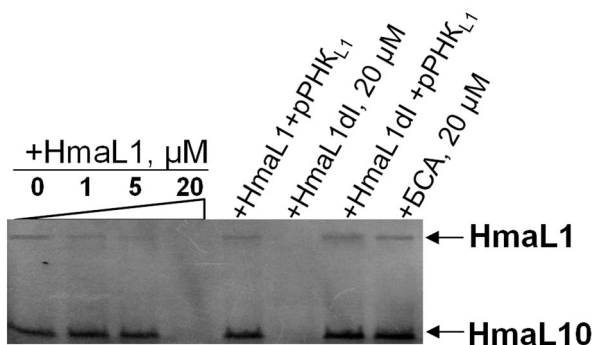


Рис. 8. Авторадиограмма белков L1 и L10 *H. marismortui*, синтезированных в присутствии L-[³⁵S]метионина, белка HmaL1 (в различных концентрациях), HmaL1dI или БСА. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* использовали плазмиду, несущую гены двух белков L1-оперона *H. marismortui* – L1 и L10, а также 5'-НТО (рHmaL1-L10(-74), рис. 1, г)

Для проверки специфичности взаимодействия белка L1 с мРНК были поставлены контрольные эксперименты. В качестве отрицательного контроля использовали плазмиду, несущую ген рибосомного белка L3 *M. jannaschii* (MjaL3) [18] (рис. 9), где было показано, что L1 не ингибирует экспрессию гена белка другого оперона. Как контроль на специфичность взаимодействия в экспериментах использовали белок БСА. Синтез белков L11-оперона *T. thermophilus*, *T. maritima* и L1-оперона *H. marismortui* не зависел от добавления БСА в реакцию систему (рис. 6–8).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие белка L1 с участками связывания мРНК L11-оперона и L1-оперона. В результате сравнительного структурного анализа комплексов TthL1 со специфическими фрагментами мРНК и рРНК были определены нуклеотиды, формирующие структурно-консервативный модуль РНК, необходимый для образования стабильного комплекса РНК–L1 [17]. Проведённый нами анализ геномных последовательностей *T. thermophilus* и *T. maritima* в районе L11-оперонов показал, что в мРНК этих бак-

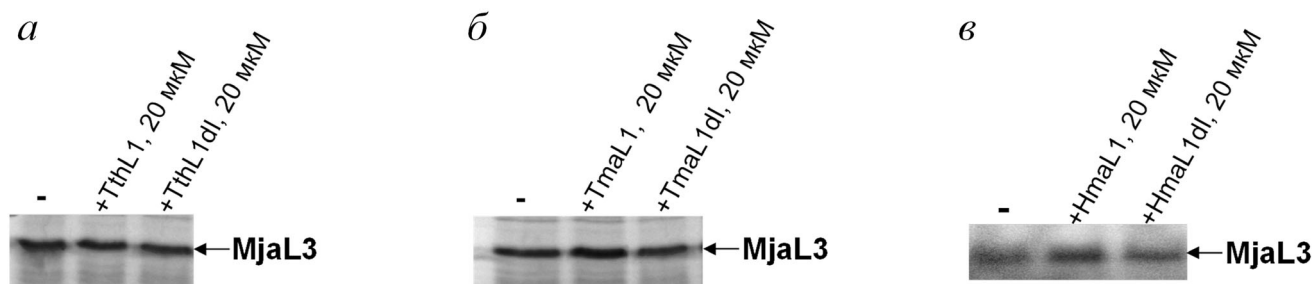


Рис. 9. Авторадиограмма белка MjaL3, синтезированного в присутствии L-[³⁵S]метионина при избытке белка L1 или его домена I: а – *T. thermophilus*; б – *T. maritima*; в – *H. marismortui*. В качестве матрицы в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* использована плаزمид, несущая ген рибосомного белка MjaL3

терий имеется два потенциальных участка связывания белка L1. Первый участок расположен, как у *E. coli*, в лидерной последовательности мРНК белка L11. Второй участок в *T. maritima* включает нетранслируемый лидерный участок и начало кодирующей части мРНК белка L1 (17 н.) (рис. 2, а). В *T. thermophilus* второй L1-связывающий участок находится в области перекрытия генов белков L11 и L1 (рис. 2, б). Эти участки гомологичны L1-связывающему сайту на рРНК [17].

Мы показали, что бактериальные рибосомные белки L1 *T. thermophilus* и *T. maritima* имеют высокое сродство к двум участкам на мРНК L11-оперона. Сродство р-белка L1 к этим участкам мРНК сравнимо ($K_D = 10^{-9}$ – 10^{-8} М (табл. 2)) с полученными ранее данными по взаимодействию TthL1 с фрагментом мРНК *M. vannielii* ($K_D = 8,6 \times 10^{-9}$ М) [19].

Ранее нам не удалось детектировать взаимодействие белка TmaL1 с фрагментом мРНК *T. maritima*, содержащим лидерный участок мРНК L1. В составе этого фрагмента были сохранены все основные детерминанты для РНК-белкового взаимодействия [6], но длина концевой спирали была короче на одну пару нуклеотидов по сравнению с двумя другими фрагментами мРНК (рис. 2, а, mRNA_{TmaL1}, пунктирная рамка). Мы предположили, что отсутствие этих нуклеотидов привело к потере двух водородных связей, важных для ориентации белка на молекуле РНК. В комплексе TthL1–мРНК *M. vannielii* Thr168, расположенный в домене I белка TthL1, образует две закрытые от растворителя водородные связи с рибозой одного из нуклеотидов последней пары фрагмента мРНК (рис. 2, а, mRNA_{TmaL1}, пунктирная рамка) [17]. В TmaL1 присутствует аналог этого аминокислотного остатка (Thr168). Ранее мы предполагали, что данные контакты не играют определяющей роли в формировании комплекса L1–РНК. Од-

нако удлинение фрагмента этого участка мРНК на две пары нуклеотидов (рис. 2, а) привело к образованию комплекса с белками TmaL1 и TmaL1dI (табл. 2). Таким образом, вероятно, роль водородной связи между белком и нуклеотидом последних двух пар концевой спирали фрагмента мРНК (U-A (-13/+16) и G-C (-14/+17) в мРНК_{TmaL1}) не менее важна для образования прочного комплекса, чем выявленные ранее водородные связи между белком L1 и консервативным L1-связывающим модулем (выделен рамкой на рис. 2).

Таким образом, р-белок L1 как в *T. thermophilus*, так и в *T. maritima*, взаимодействует с двумя специфическими участками на мРНК своего оперона. По всей видимости, связываясь с этими участками мРНК, р-белок L1 может регулировать уровень синтеза белков L11-оперона в соответствующих организмах *in vitro* и *in vivo*.

Однако характер взаимодействия белков L1 с фрагментами мРНК_{L1} и мРНК_{L11} может различаться. Анализ взаимодействия как полноразмерного р-белка L1, так и его домена I со специфическими фрагментами мРНК_{L11} методом поверхностного плазмонного резонанса показывает, что наиболее подходящей является модель Ленгмюра (1 : 1) (рис. 3, а, табл. 2). Взаимодействие белков со специфическими фрагментами мРНК_{L1} можно описать только моделью двухстадийной реакции (рис. 3, б, табл. 2). Такая модель была использована нами ранее для описания взаимодействий в комплексах мутантных форм белка TthL1 со специфическим фрагментом 23S рРНК [16]. В этой модели два компонента формируют сначала промежуточный комплекс с константами скорости ассоциации и диссоциации k_{a1} и k_{d1} , далее образуя конечный комплекс с кинетическими константами k_{a2} и k_{d2} . Промежуточный комплекс формируется быстро, затем следует медленный конформационный переход в более стабильный комплекс.

В мРНК L1-оперона архей *H. marismortui* мы обнаружили только один участок, гомологичный консервативному участку связывания белка L1 на 23S рРНК, — в лидерной последовательности мРНК белка L1 (рис. 2, в, з). HmaL1 и его домен I связываются с этим участком мРНК, причем это взаимодействие слабее, чем с рибосомной РНК ($K_D(\text{HmaL1-мРНК}_{\text{Hma}}) = 417 \text{ нМ}$, $K_D(\text{HmaL1-рРНК}_{\text{Hma}}) = 45,6 \text{ нМ}$, табл. 2). Такое различие согласуется с принципом классической регуляции синтеза рибосомных белков (ингибирование по принципу обратной связи), основанном на конкуренции между двумя участками связывания.

Сродство домена I как бактериальных, так и архейного белка L1 к фрагментам мРНК является примерно таким же, как сродство полноразмерного белка ($K_D(\text{HmaL1-мРНК}_{\text{Hma}}) = 417 \text{ нМ}$, $K_D(\text{HmaL1dI-мРНК}_{\text{Hma}}) = 846 \text{ нМ}$, табл. 2), что позволяет предположить, что L1dI может обладать такими же регуляторными свойствами, как бактериальный TthL1dI [9] и архейный MjaL1dI [20].

Регуляция синтеза белков L11-оперона и L1-оперона белком L1 и его доменом I. Для доказательства регуляторных свойств белка L1 и его домена I мы исследовали их дозозависимое влияние на уровень синтеза белков L11-оперона *T. thermophilus*, *T. maritima* и L1-оперона *H. marismortui*. Подобные эксперименты проводились ранее для исследования ауторегуляции синтеза белков L1-оперона архейным рибосомным белком L1 *M. vannielii* [2], а также для определения регуляторных свойств TthL1/TthL1dI и MjaL1/MjaL1dI на мРНК *M. vannielii* [9, 20]. Бесклеточная система транскрипции-трансляции *E. coli* может быть использована как для экспрессии архейных, так и эукариотических белков [21].

Как упоминалось выше, мы показали наличие двух регуляторных участков в мРНК L11-оперона бактерий *T. thermophilus* и *T. maritima*. Стоит отметить, что структурно-консервативный участок связывания белка L1 на РНК включает последовательность GGAG (рис. 2), которая может быть принята за SD-подобный мотив мРНК, будучи расположенной перед AUG-кодоном. Однако, согласно структурным данным, 3 из 4-х нуклеотидов этой последовательности находятся в спиральных участках [17] и недоступны для РНК-РНКовых взаимодействий. В результате такой участок мРНК взаимодействует с р-белком L1, но не связывается с анти-SD на рибосоме. Ранее было показано наличие такой «маскированной» SD-последовательности в мРНК белка L1 *E. coli* [22]. Для того чтобы в полной мере исследовать регуляторные свойства белка TthL1, мы получили констру-

цию, содержащую ген белка TthL1 с добавленной последовательностью, содержащей SD, поскольку природный SD-подобный мотив входил в состав L1-связывающего участка. Известно, что положение предположительного L1-связывающего сайта в мРНК L11-оперона в различных родах бактерий не строго консервативно. В мРНК *E. coli* имеется единственный L1-связывающий участок, а в геномах некоторых бактерий типа *Firmicute* обнаружены два потенциальных участка связывания белка L1 [5], также как в исследованных нами бактериях *T. thermophilus* и *T. maritima*. В отличие от данных литературы, наличие двух регуляторных участков L11-оперона в этих гипертермофильных бактериях подтверждено нами экспериментально. Несомненно, в термофильных организмах имеются механизмы, поддерживающие рост клеток при высоких температурах. Геномный анализ промоторов и рибосом-связывающих участков в *T. maritima* показал [23], что они кодируют высококонсервативные жесткие структуры, которые могут обеспечить плотные контакты, что очень важно в термодинамически неблагоприятных условиях (75–80 °C). Наличие двух L1-связывающих участков может являться примером усиленной регуляции синтеза белков L11-оперона у бактерий, живущих в гипертермофильных условиях.

В случае экстремального галофила *H. marismortui* был обнаружен один регуляторный участок, взаимодействие с которым р-белка L1 может ингибировать синтез белков своего L1-оперона. Можно заметить, что в бесклеточной системе транскрипции-трансляции *E. coli* количество синтезированного белка L1 архей *H. marismortui* было ниже, чем белка L11 (рис. 8). Ранее при анализе регуляции трансляции мРНК L1-оперона другой архей *M. vannielii* в такой же *in vitro* системе *E. coli* наблюдалась аналогичная ситуация [2], причём в *in vivo* системе *E. coli* соотношение синтеза белков, кодируемых генами этого архейного оперона, было другим. Такие отличия могут быть связаны с особенностями синтеза белков в системе *in vitro*.

В археях рода *Methanococcus* участок связывания белка L1 находится в начале его кодирующей части мРНК (первые 30 нуклеотидов после старт-кодона) [2]. Мы показали, что в *H. marismortui* регуляторный участок находится в 5'-НТО мРНК белка L1. При связывании белка HmaL1 ингибируется синтез белков L1, L11 и, предположительно, L12. Полученные нами данные подтверждают консервативность регуляторных свойств р-белка L1. При этом важно отметить, что ведущую роль в регуляторных свойствах белка в исследуемых организмах иг-

рает его домен I, что свидетельствует о структурной консервативности РНК-белковых взаимодействий. Более того, наличие двух регуляторных участков на мРНК L11-оперона гипертермофильных бактерий экспериментально подтверждено.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gourse, R. L., Thurlow, D. L., Gerbi, S. A., and Zimmermann, R. A. (1981) Specific binding of a prokaryotic ribosomal protein to an eukaryotic ribosomal RNA: implications for evolution and autoregulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2722-2726, doi: 10.1073/pnas.78.5.2722.
2. Hanner, M., Mayer, C., Köhrer, C., Golderer, G., Gröbner, P., and Piendl, W. (1994) Autogenous translational regulation of the ribosomal MvaL1 operon in the archaeobacterium *Methanococcus vannielii*, *J. Bacteriol.*, **176**, 409-418, doi: 10.1128/jb.176.2.409-418.1994.
3. Baughman, G., and Nomura, M. (1984) Translational regulation of the L11 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: analysis of the mRNA target site using oligonucleotide-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5389-5393, doi: 10.1073/pnas.81.17.5389.
4. Mayer, C., Köhrer, C., Gröbner, P., and Piendl, W. (1998) MvaL1 autoregulates the synthesis of the three ribosomal proteins encoded on the MvaL1 operon of the archaeon *Methanococcus vannielii* by inhibiting its own translation before or at the formation of the first peptide bond, *Mol. Microbiol.*, **27**, 455-468, doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00693.x.
5. Fu, Y., Deiorio-Haggar, K., Anthony, J., and Meyer, M. M. (2013) Most RNAs regulating ribosomal protein biosynthesis in *Escherichia coli* are narrowly distributed to Gammaproteobacteria, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3491-3503, doi: 10.1093/nar/gkt055.
6. Mikailina, A. O., Kostareva, O. S., Nikonova, E. Yu., Garber, M. B., and Tishchenko, S. V. (2018) Identification of binding sites for ribosomal protein L1 on mRNA of *Thermus thermophilus* and *Thermotoga maritima*, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **52**, 98-105.
7. Kraft, A., Lutz, C., Lingenhel, A., Gröbner, P., and Piendl, W. (1999) Control of ribosomal protein L1 synthesis in mesophilic and thermophilic archaea, *Genetics*, **152**, 1363-1372.
8. Tishchenko, S., Nikonova, E., Kljashtorny, V., Kostareva, O., Nevskaya, N., and Piendl, W. (2007) Domain I of ribosomal protein L1 is sufficient for specific RNA binding, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7389-7395, doi: 10.1093/nar/gkm898.
9. Korepanov, A. P., Kostareva, O. S., Bazhenova, M. V., Bubunenko, M. G., Garber, M. B., and Tishchenko, S. V. (2015) Studying the properties of domain I of the ribosomal protein L1: incorporation into ribosome and regulation of the L1 operon expression, *Protein J.*, **34**, 103-110, doi: 10.1007/s10930-015-9602-5.
10. Studier, F., Rosenberg, A., Dunn, J., and Dubendorff, J. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *J. Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
11. Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., and Mierendorf, R. (2001) Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression, *in* *Innovations*, **12**, 1-3.
12. Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
13. Gabdulkhakov, A., Tishchenko, S., Mikhaylina, A., Garber, M., Nevskaya, N., and Nikonov, S. (2017) Crystal structure of the 23S rRNA fragment specific to r-protein L1 and designed model of the ribosomal L1 stalk from *Haloarcula marismortui*, *Crystals*, **7**, 37, doi: 10.3390/cryst7020037.
14. Katsamba, P. S., Park, S., and Laird-Offringa, I. A. (2002) Kinetic studies of RNA-protein interactions using surface plasmon resonance, *Methods*, **26**, 95-104, doi: 10.1016/S1046-2023(02)00012-9.
15. Kostareva, O., Tishchenko, S., Nikonova, E., Kljashtorny, V., Nevskaya, N., et al. (2011) Disruption of shape complementarity in the ribosomal protein L1-RNA contact region does not hinder specific recognition of the RNA target site, *J. Mol. Recognit.*, **24**, 524-532, doi: 10.1002/jmr.1063.
16. Tishchenko, S., Kostareva, O., Gabdulkhakov, A., Mikhaylina, A., Nikonova, E., et al. (2015) Protein-RNA affinity of ribosomal protein L1 mutants does not correlate with the number of intermolecular interactions, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 376-386, doi: 10.1107/S1399004714026248.
17. Nevskaya, N., Tishchenko, S., Volchkov, S., Kljashtorny, V., Nikonova, E., et al. (2006) New insights into the interaction of ribosomal protein L1 with RNA, *J. Mol. Biol.*, **355**, 747-759, doi: 10.1016/j.jmb.2005.10.084.
18. Mikhaylina, A., Kostareva, O., Sarskikh, A. V., Feodorov, R. V., Pindl, V., et al. (2014) Study of the regulatory properties of archaeal ribosomal protein L4, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 87-95.
19. Tishchenko, S., Kljashtorny, V., Kostareva, O., Nevskaya, N., Nikulin, A., et al. (2008) Domain II of *Thermus thermophilus* ribosomal protein L1 hinders recognition of its Mrna, *J. Mol. Biol.*, **383**, 301-305, doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.058.
20. Mikhailina, A., Kostareva, O., Nikonova, E., and Tishchenko, S. (2016) Analysis of the interaction of domain I of archaeal ribosomal protein L1 with specific RNA fragments, *Aktual. Vopr. Biol. Khim.*, **1**, 239-243.
21. Chen, F., Wang, J., Du, L., Zhang, X., Zhang, F., et al. (2019) Functional expression of olfactory receptors using cell-free expression system for biomimetic sensors towards odorant detection, *Biosens. Bioelectron.*, **130**, 382-388.
22. Sor, F., Bolotin-Fukuhara, M., and Nomura, M. (1987) Mutational alterations of translational coupling in the L11 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **169**, 3495-507.
23. Latif, H., Lerman, J. A., Portnoy, V. A., Tarasova, Y., Nagarajan, H., et al. (2013) The genome organization of *Thermotoga maritima* reflects its lifestyle, *PLoS Genet.*, **9**, e1003485, doi: 10.1371/journal.pgen.1003485.

CHARACTERIZATION OF REGULATORY ELEMENTS OF L11 AND L1 OPERONS IN THERMOPHILIC BACTERIA AND ARCHAEA

A. O. Mikhaylina^{1*}, E. Y. Nikonova¹, O. S. Kostareva¹,
W. Piendl², M. Erlacher³, and S. V. Tishchenko¹

¹ Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Russia; E mail: alisamikhaylina15@gmail.com

² Division of Medical Biochemistry, Biocenter, Medical University of Innsbruck,
6020 Innsbruck, Austria; E mail: wolfgang.piendl@i-med.ac.at

³ Division of Genomics and RNomics, Biocenter, Medical University of Innsbruck,
6020 Innsbruck, Austria; E mail: matthias.erlacher@i-med.ac.at

Ribosomal protein L1 is a conserved two-domain protein that is involved in formation of the L1 stalk of the large ribosomal subunit. When there are no free binding sites available on the ribosomal 23S RNA, the protein binds to the specific site on the mRNA of its own operon (L11 operon in bacteria and L1 operon in archaea) preventing translation. Here we show that the regulatory properties of the r-protein L1 and its domain I are conserved in the thermophilic bacteria *Thermus* and *Thermotoga* and in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. At the same time the revealed features of the operon regulation in thermophilic bacteria suggest presence of two regulatory regions.

Keywords: regulation of expression, L11 operon, L1 operon, r-proteins, mRNA