



УДК 577.21

Е. Б. Патон

## МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ В КЛАСТЕРЕ *rplKAIL-rpoBC* *ESCHERICHIA COLI*

В обзоре описаны механизмы регуляции экспрессии генов в кластере *rplKAIL-rpoBC* *E. coli*, осуществляемые на уровне транскрипции и трансляции. Рассмотрены, в частности, функциональная роль структуры мРНК, структура регуляторных рибосомных белков, сопряженность трансляции полицистронных мРНК, кодирующих эти белки, транскрипционный контроль в «*rif*»-области и аутогенная регуляция синтеза  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц РНК-полимеразы, а также особенности конструирования рекомбинантных ДНК, связанные с экспрессией этих генов.

Гены кластера *rplKAIL*, расположенного в «*rif*»-области на 88-й минуте хромосомы *E. coli*, кодируют синтез четырех рибосомных белков: *L11*, *L1*, *L10* и *L7/L12* (рис. 1). Гены 52 известных к настоящему времени рибосомных белков *E. coli* располагаются в 20 оперонах, кодирующих от одного до восьми рибосомных белков. Наибольшая часть белков (31) программируется «*spc-str*»- и «*rif*»-областями хромосомы [1—3], название которых является следствием традиционного генетического подхода к картированию генов рибосомных белков с использованием для селекции маркеров антибиотикоустойчивости. Помимо генов *rplKAIL*, «*rif*»-область содержит также гены *rpoBC*, кодирующие синтез субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*  $\beta$  и  $\beta'$ . Объединение генов *rplJ*, *rplL*, *rpoB* и *rpoC* особенно характерно для бактерий. Как показал предпринятый Титтавеллой [4] анализ этого кластера, он высококонсервативен у *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabile*.

Первые опыты по изучению организации генов в «*rif*»-области хромосомы основывались на данных, полученных с помощью трансдуцирующих фагов. После УФ-облучения клеток [5] изучали продукты экспрессии генов введенного в такие клетки трансдуцирующего бактериофага. В результате экспериментального исследования *in vitro* продуктов белкового синтеза, программируемых целым трансдуцирующим фагом или отдельными его фрагментами, было сделано заключение об организации генов «*spc-str*»- и «*rif*»-областей хромосомы в опероны. Конструирование рекомбинантного фага  $\lambda_{rifd_{18}}$  стало первоосновой для последующей серии рекомбинантных плазмид и позволило определить первичную структуру кластера генов *rplKAIL* [6].

Механизмы регуляции активности генов «*rif*»-области хромосомы *E. coli* были предметом нескольких детальных обзоров [1—3, 5, 7, 8] и продолжают представлять интерес в связи с возможностью еще более детального выяснения ряда характерных особенностей функциональной организации и механизмов контроля экспрессии генов, обеспечивающих, в частности, неэквивалентный синтез рибосомного белка *L7/L12* по отношению ко всем остальным рибосомным белкам *E. coli*. Несмотря на то, что транскрипция генов *rplJL* и *rpoBC* осуществляется с одного промотора —  $P_{L10}$ , — данные гены разобщены аттенуатором транскрипции и представляют собой две независимые регуляторные единицы — рибосомные белки *L10* и *L7/L12* регулируются аутогенно на уровне трансляции регуляторным белком *L10* (или комплексом его с

L7/L12), синтез же субъединиц РНК-полимеразы контролируется голоферментом или комплексом субъединиц. Данная работа представляет попытку обзора экспериментальных данных о механизмах контроля экспрессии генов *rplKAIL-rpoBC*, полученных в последние годы.

**Модель регуляции по принципу обратной связи.** Экспериментально показано, что синтез подавляющего большинства рибосомных белков *E. coli* сбалансирован и находится в строгой зависимости от скорости роста и состава среды [9]. Моделью регуляции по принципу обратной связи, которая разработана на основе детального изучения

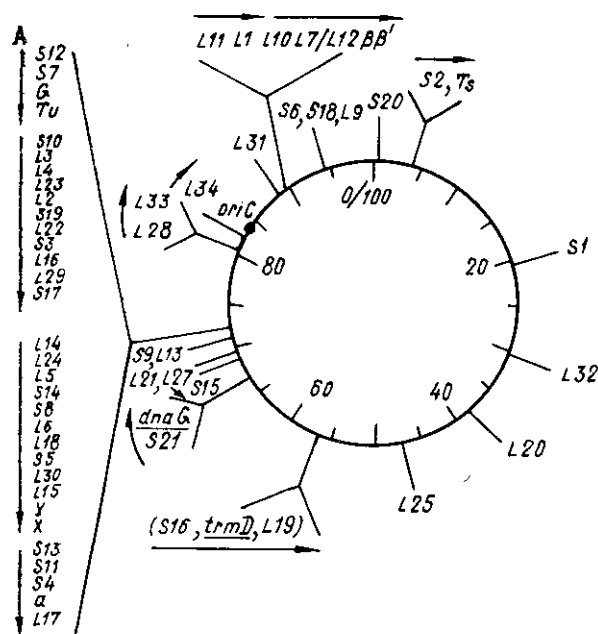


Рис. 1. Генетическая карта хромосомы *E. coli*. Указаны «*spc-str*» и «*rif*» локусы, расположенные на 73-й и 88-й минуте хромосомы соответственно.  $P_{L11}$ ,  $P_{L10}$ ,  $P_{L12}$ ,  $P_{\beta}$  и  $P_{\beta'}$  — промоторы. Гены *rplKAIL* и *rpoBC* кодируют синтез рибосомных белков *L11*, *L1*, *L10* и *L7/L12* и субъединиц РНК-полимеразы  $\beta$  и  $\beta'$ . Карта приведена в соответствии с данными [1, 2]

Fig. 1. Genetic map of the *E. coli* chromosome, showing location of the «*spc-str*» and «*rif*» regions at the 73d and 88th minutes of chromosome, respectively.  $P_{L11}$ ,  $P_{L10}$ ,  $P_{L12}$ ,  $P_{\beta}$ ,  $P_{\beta'}$  — promoters. Genes *rplKAIL* and *rpoBC* encode the synthesis of ribosomal proteins *L11*, *L1*, *L10*, *L7/L12* and subunits  $\beta$  and  $\beta'$  of the RNA polymerase. The map is based on the data of [1, 2]

генов, расположенных в «*rif*» и «*spc-str*»-областях хромосомы, удалось объяснить строгую координацию синтеза рибосомных белков (рис. 2, [7]). Принципиально она заключается в том, что синтез рибосомных белков сопряжен со сборкой рибосом (рис. 2). Когда количество синтезированных рибосомных белков превосходит необходимое для сборки рибосом, некоторые из свободных белков, являющихся регуляторными, действуют в качестве трансляционных репрессоров для мРНК контролируемых ими оперонов. Модель регуляции по принципу обратной связи была создана на основе результатов, полученных при изучении эффектов повышения дозы генов [10], и затем получила подтверждение вследствие многочисленных экспериментов, проведенных как *in vivo*, так и *in vitro* [7]. Характерные черты функциональной организации генов, кодирующих синтез рибосомных белков *E. coli*, как отмечается Номурой [7], заключаются в следующем: а) эти гены объединены в функциональные единицы, регулируемые на уровне трансляции мРНК репрессорным белком, который кодируется геном, расположенным в данной единице (рис. 3). Изучение организации «*rif*»-области показало, что такие единицы могут быть в свою очередь объединены на уровне транскрипции. Так, например, тетрацистронный транскрипт генов *rplJL-rpoBC* иницируется промотором  $P_{L10}$ . На уровне трансляции каждый из оперонов — *rplJL* и *rpoBC* — контролируется собственным регулятором — белком *L10* и голоферментом РНК-полимеразы соответственно [1, 11, 12]; б) регуляторный (репрессорный) рибосомный белок взаимодействует в единственном сайте — последовательности-мишени с полицистронной мРНК, регулируя трансляцию всех белков, кодируемых данной регуляторной единицей. Последовательности-мишени, как показано к настоящему времени, расположены, в основном, вблизи

сайтов инициации трансляции первого из генов данной регуляторной единицы; в) взаимодействие с репрессором блокирует трансляцию первого цистрона данной единицы и вследствие этого всех остальных цистронов, так как трансляция их сопряжена; г) экспериментальные данные позволяют заключить, что механизм репрессии на уровне трансляции основывается на конкуренции за связывание с регуляторным белком участков м- и рРНК, имеющих сходную структуру [13]. Пред-

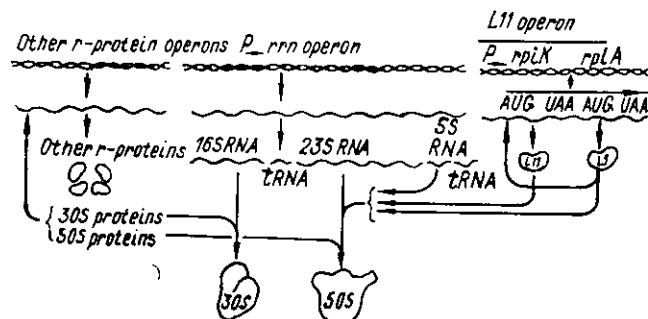


Рис. 2. Схематическое изображение регуляции синтеза рибосомных белков *L11* и *L1* *E. coli* по принципу обратной связи на уровне трансляции [7]. Гены *rplKA* кодируют синтез рибосомных белков *L11* и *L1* и транскрибируются в виде бицистронной матрицы. Трансляция обоих цистронов сопряжена и регулируется белком *L1*, имеющим специфический сайт взаимодействия с лидерной последовательностью мРНК перед цистроном *L11*. В случае избыточного для сборки рибосом количества свободных белков *L11* и *L1* последний блокирует трансляцию, во время синтеза рРНК и сборки рибосом свободные белки *L11* и *L1* связываются с рРНК, включаясь в рибосомы, и не препятствуют таким образом трансляции мРНК

Fig. 2. Schematic representation of feedback regulation at the level of translation of ribosomal proteins *L11* and *L1* [7]. Genes *rplKA* encoding the synthesis of  $\gamma$ -proteins *L11* and *L1* are transcribed as the bicistronic mRNA. Translation of the both cistrons is coupled and regulated by protein *L1*, having a specific binding site in the mRNA leader sequence upstream the *L11* cistron. When the amount of free *L11* and *L1* proteins exceeds the necessary for ribosome assembly free proteins *L11* and *L1* blocks translation. During the rRNA synthesis and ribosome assembly free proteins *L11* and *L1* bound to the rRNA are incorporated into the ribosomes and do not inhibit mRNA translation

почтительно репрессорные белки связываются с рРНК, формируя рибосому, однако синтезируясь в избыточном количестве, они получают определенную возможность взаимодействия с последовательностью-мишенью на мРНК.

Открытие регуляции активности генов, кодирующих синтез рибосомных белков, по принципу обратной связи заставило пересмотреть предшествовавшее представление о том, что эта регуляция, зависящая от скорости роста клеток, осуществляется на уровне транскрипции [14—16]. В соответствии с новой интерпретацией, предложенной Миурой и др. [17] и Номурой с соавт. [3], мРНК рибосомных белков обычно синтезируется в избытке и, таким образом, экспрессия генов рибосомных белков транскрипционно не лимитируется. Синтез рибосомных белков ограничен количеством компонентов рибосомы (обычно рРНК) посредством механизма контроля по принципу обратной связи. Вывод о том, что зависимость синтеза рибосомных белков от скорости роста клеток не контролируется на уровне транскрипции, подтвердился элегантными экспериментами *in vivo*, в которых для определения эффективности промоторов при варьировании скорости роста клеток проводилось их слияние с детекторными генами [17, 18]. Еще более яркое подтверждение этого было получено в лаборатории Номуры с помощью мутации в лидерной последовательности мРНК белка *L11*. Данная мутация *MN2* является заменой 2 пар оснований (п. о.), нарушающей вторичную структуру последовательности-мишени регуляторного белка *L1*. После переноса мутации в хромосому в зависимости от условий роста клеток измерялась скорость синтеза белков *L1* и *L11*. В клетках, несущих мутацию *MN2*, наблюдалась сверхпродукция обоих белков,

причем соотношение скорости их синтеза и скорости синтеза тотального белка не зависело от скорости роста.

Эксперименты по изучению эффекта дозы генов рибосомных белков [10, 19, 20] показали, что скорость синтеза мРНК рибосомных белков увеличивается пропорционально количеству копий генов, при этом стационарное количество мРНК увеличивается лишь очень незначительно. Как уровень трансляционной репрессии, так и скорость распада мРНК рибосомных белков возрастает с уменьшением скорости

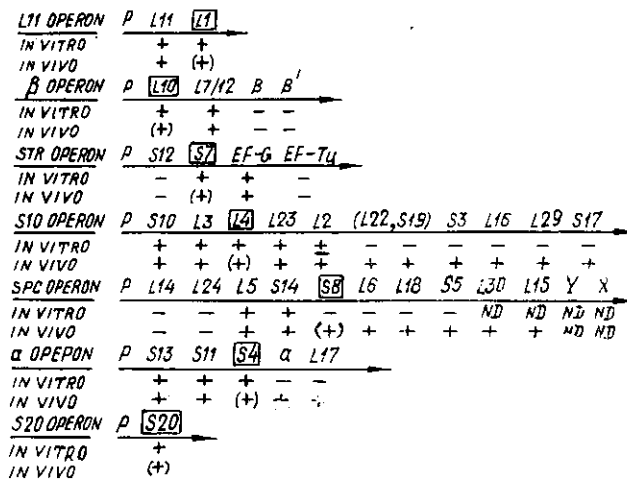


Рис. 3. Схематическое изображение оперонов рибосомных белков [3]. Регуляторные белки, контролирующие экспрессию генов *in vivo* и *in vitro*, выделены рамками. Указано положение промоторов (P), гены представлены кодируемыми белковыми продуктами. Условные обозначения: «+» — специфическое ингибирование синтеза; «-» — отсутствие заметного влияния регуляторного рибосомного белка; «±» — слабое ингибирование синтеза; «(+) — предполагаемое ингибирование *in vivo*; ND — не определено

Fig. 3. Schematic drawing of ribosomal protein operons [3]. Proteins regulating gene expression are boxed. Genes are represented by the encoded proteins, location of promoters (P) is indicated. The following symbols are used to show: «+», significant inhibition; «-», absence of significant inhibition; «±», weak inhibition; «(+), inhibition assumed to occur *in vivo*; ND, is not determined

роста. Таким образом, возник вопрос о том, стимулирует ли связывание мРНК с трансляционным репрессором деградацию мРНК, или же увеличение скорости деградации мРНК является простым следствием ингибирования ее трансляции. Ответ на него был недавно получен с помощью опытов на трех штаммах *E. coli*: 1) штамме, содержащем плазмиду с ненарушенным сайтом взаимодействия с репрессорным белком L1; 2) штамме, содержащем плазмиду с мутацией MN2, нарушающей контроль регуляторным белком L1, а также 3) штамме с плазмидой, несущей дополнительную мутацию в участке связывания рибосом, нарушающую инициацию трансляции в вышеуказанном мутантном опероне. Было показано, что период полужизни мРНК L11 возрастал во втором штамме и был коротким в третьем [7]. Оказалось, что связывание с репрессорным белком само по себе не стимулировало деградации мРНК. Скорее, по мнению авторов [7], стимулирование деградации трансляционно репрессированной мРНК происходило вследствие ингибирования инициации трансляции, вероятно из-за того, что мРНК, не защищенная связыванием с рибосомой, оказалась легкодоступной для клеточных нуклеаз. Предполагается [7], что стимулирование скорости деградации мРНК в результате связывания ее с репрессорными белками может иметь отношение к обеспечению эквимолярности синтеза рибосомных белков в мультицистронных оперонах. В основе координированного и сбалансированного синтеза рибосомных белков, кодируемых генами одного и того же оперона, лежит трансляционное сопряжение и регуляция проксимальных и дистальных цистронов единым

регуляторным белком. Однако, если эффективность сопряжения *in vivo* не полная, в конечном счете это может привести к накоплению большого избыточного количества синтезирующихся белков, кодируемых дистальными генами оперона. Возможно, структура интактной мРНК рибосомных белков обеспечивает доступность их в отсутствие трансляции действию специфических нуклеаз, исключая тем самым нерегулируемый синтез белков, программируемых дистальными цистронами [7].

**Функциональная роль структуры мРНК. Последовательности-мишени регуляторных белков.** мРНК *L11-L1*. Первые эксперименты, проведенные *in vitro*, показали, что добавление в ДНК-зависимую систему синтеза белка очищенного белка *L1* специфически блокирует синтез как самого белка *L1*, так и белка *L11*, кодируемого одной с ним бицистронной мРНК [21]. Ингибирующий эффект суперпродукции регуляторных рибосомных белков был подтвержден и проведением опытов с помощью рекомбинантных мультикопийных плазмид, программирующих повышенный синтез белков *L1* (регуляторного для *rplKA* оперона) и *L10* (регулирующего трансляцию бицистронной матрицы *L10-L7/L12*). Введение в клетки *E. coli* мультикопийных плазмид — продуцентов белков *L1* и *L10* — приводило к подавлению экспрессии хромосомных генов *rplK* (белок *L11*) и *rplL* (белок *L7/L12*) соответственно. Последующие эксперименты позволили локализовать последовательности-мишени на мРНК, обеспечивающие связывание регуляторных рибосомных белков.

Сайт-мишень для рибосомного белка *L1* был обнаружен в первых 160 основаниях бицистронной мРНК *L11-L1* [22]. Добавление в систему *in vitro* очищенной 23S рРНК снимало ингибирование белком *L1*, подтверждая таким образом правильность гипотезы о конкурентном связывании регуляторного рибосомного белка с последовательностями на 23S рРНК и мРНК. В конечном счете с помощью таких экспериментов удалось показать сопряженность трансляции белков *L11* и *L1*. Это было первым свидетельством в пользу данного явления в оперонах, кодирующих рибосомные белки, и послужило основой для предположения о том, что именно такой механизм может контролировать эквимолярность синтеза всех рибосомных белков, котранскрибируемых в данном конкретном опероне. Сравнение вторичной структуры лидерной последовательности мРНК *L11-L1* и сайта связывания белка *L1* на 23S рРНК выявило поразительную гомологию [23, 24] в двух участках, каждый из которых содержит район с двуспиральной структурой. Делеционный мутагенез [25, 26] показал, что нарушение первого из спирализованных участков в лидерной последовательности мРНК *L11-L1* не влияет на трансляционную регуляцию белком *L1*. Изменение же структуры второго, напротив, полностью нарушило регуляцию белком *L1*, в результате чего добавление этого белка не оказало влияния на экспрессию генов *rplKA*, клонированных на мультикопийной плазмиде. Для детального выяснения роли отдельных G—C-пар во втором спирализованном участке использовали сайт-специфический мутагенез, подтвердивший их регуляторную функцию на уровне трансляции мРНК. Анализ второго спирализованного участка мРНК *L11-L1* с помощью структуро-специфических нуклеаз, подтвердил критическую роль данной области мРНК [1]. Большинство мутаций, влияющих на регуляцию *rplKA* оперона *L1* белком [27], затрагивали нуклеотиды 48—54 и 74—76, позволяя рассматривать эту область как существенную для регуляции белком *L1*. Выяснилась также важная роль некоторых уридиновых остатков в районе 40-го нуклеотида. Экспериментальные данные [27] свидетельствуют о том, что в 23S рРНК существуют G—C-пары в позициях 2127—2129 и 2159—2161, которые сохраняются филогенетически [24]. Исходя из этих данных, было высказано предположение, [27], что подобная 23S рРНК G—C-стеблевая структура должна формироваться и в лидерной последовательности мРНК (нуклеотиды 49—51 и 74—76) и является существенной для трансляционной регуляции белком *L1* [24, 25, 27]. Применение структуро-специфических нук-

леаз для анализа лидерной последовательности мРНК *L11* [28] подтвердило наличие такой структуры. Исследование точечных мутаций выявило, что особенно важное значение для регуляции белком *L1* имеют нуклеотиды в позициях 48, 52, 53 и 54. Неспаренное основание  $A_{53}$ , по предположению Томаса и Номуры [27], может непосредственно участвовать во взаимодействии с белком *L1*. Результаты мутационного анализа и сравнения структуры лидерной последовательности мРНК *L11* для *P. vulgaris* и *S. marcescens* [29] и сайтов связывания *L1* белка на 23S рРНК *P. vulgaris* и *B. stearothermophilus* [23] позволили сделать вывод о структурной гомологии рРНК и мРНК, обеспечивающей регуляцию белком *L1*. Такая же структура сохраняется и в презумптивном *L1* связывающем сайте 28S рРНК из *Xenopus* [24].

Изучая структуру лидерной последовательности мРНК *L11* с помощью *ccc*- и *dcc*-специфичных нуклеаз, Керни и Номура [28] сделали заключение о том, что рибосомо-связывающий участок мРНК *L11* (нуклеотиды  $G_{99}-G_{102}$ ) находится вблизи, но не включает трех  $G-C$ -пар, важных для регуляции; инициаторный кодон  $A_{111}UG_{113}$  соседствует или находится вблизи района слабого спаривания (основания 57—61 и 111—107), предположительно важного для регуляции. Возможно, что регуляторный белок может стабилизировать прямо или непрямо вторичную структуру, препятствуя инициации трансляции [28]. Вторым вариантом регуляции может быть связывание репрессорного белка *L1* с протяженным стеблевым участком с общей последовательностью GGGAG, достаточное для предотвращения взаимодействия рибосом с последовательностью Шайна—Далгарно по стерическим причинам.

мРНК *L10-L7/L12*. Первое указание на аутогенную регуляцию синтеза рибосомных белков *L10* и *L7/L12* на посттранскрипционном уровне было получено в экспериментах по изучению эффекта дозы гена *rplJ* [30]. Далее было показано, что белок *L10* или комплекс его с *L7/L12* действует как репрессор трансляции для себя самого, а также для *L7/L12* [30—33]. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что ингибирование белком *L10* происходит до образования первой пептидной связи [34] и что он регулирует трансляцию, связываясь с мРНК вблизи сайта инициации трансляции гена *rplJ* [33]. Выделены мутанты, у которых изменения в лидерной последовательности перед геном *rplJ* блокировали регуляцию на уровне трансляции [35].

Детальный анализ серии мутаций, нарушающих регуляцию синтеза  $\beta$ -галактозидазы, кодируемой модельным геном *rplJ-lacZ* [35] показал, что области, критические для эффективности трансляции мРНК и регуляции трансляции этой мРНК белком-регулятором, тесно взаимосвязаны и расположены в центральной части лидерной последовательности мРНК, 70—195 основаниями выше кодона ATG гена *rplJ*. Делеция 96 оснований выявила необходимость центральной области лидерной последовательности для эффективной трансляции. Присутствие в рекомбинантной плазмиде такой делеции полностью исключало экспрессию гена *rplJ-lacZ*. Таким образом, район, удаленный на 100 оснований и более, оказывал сильнейшее влияние на эффективность трансляции. Авторы высказали предположение о том, что сложная вторичная структура мРНК в лидерном участке может иметь отношение к обеспечению неэквивалентного синтеза белков *L10* и *L7/L12*. С помощью плазмиды, обеспечивающей повышенный синтез белка *L10*, летальный для клеток-хозяев, были получены мутанты, нарушающие трансляцию гена *rplJ*. Анализ нуклеотидной последовательности позволил выделить два кластера этих мутаций. Оба они расположены в лидерной последовательности, примерно посередине между промотором  $P_{L10}$  и структурной частью гена *rplJ*. Четыре из охарактеризованных мутаций представляли собой точечные замены в районе, потенциально способном образовывать устойчивую шпильчатую структуру, и располагались примерно на 90 нуклеотидов перед началом кодирующей последовательности белка *L10*. Три из этих мутаций нарушали потенциальные  $G-C$ -пары, четвертая располагалась в петле. Две остальные мутации локализовались

примерно на 70 нуклеотидов выше шпилечной структуры и нарушали область Шайна — Далгарно. Таким образом, изученные мутации позволили выявить область лидерной последовательности, регулирующую эффективность трансляции мРНК *rplJ*. По предположению Фила и др. [36], обнаруженные мутации изменяют структуру мРНК, имитируя ингибирование трансляции, происходящее при связывании мРНК с регуляторным белком. Измерение константы связывания комплекса белков *L10* и *L7/L12* с лидерной последовательностью мРНК *rplJ* (с двумя точечными мутациями в 1548 и 1634 позициях) обнаружило полное нарушение связывания, обусловленное первой заменой и сильно редуцированное — в случае второй. На основании обнаруженного эффекта авторы [37] предложили модель вторичной структуры лидерной последовательности мРНК *rplJ*, которая предполагает наличие двух форм, обеспечивающих возможность и невозможность ее трансляции в результате взаимодействия с регуляторным белком *L10* или комплексом белков *L10* и *L7/L12*. Для изучения участка мРНК, вовлеченного во взаимодействие с регуляторным белком *L10* или комплексом его с белком *L7/L12*, Клими и Фризенем был сконструирован набор мутантов лидерного района мРНК *rplJ* с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза [38]. Из полученных мутаций несколько представляют собой делеции, другие — серию точечных замен. Все отобранные мутации нарушают регуляцию белком *L10* и располагаются в структуре стебельного участка, локализованного на 140 нуклеотидов выше сайта инициации трансляции. Структура включает 12 спаренных нуклеотидов, 4 основания, образующих стебель и петлю, и 6 оснований петли. Предполагается, что точечные мутации, нарушающие «feedback» регуляцию, нарушают и вышеуказанную структуру. В псевдоревертантах отобранных мутаций, полученных комбинированием пар точечных мутаций, восстанавливалась структура мРНК и регуляция белком-репрессором. В результате проделанного эксперимента была определена область вторичной структуры мРНК *rplJ*, необходимая для осуществления «feedback» контроля. Делеция шести нуклеотидов в петле в положении 1570—1575 значительно уменьшает «feedback» регуляцию, делая правомерным вывод о необходимости этой структуры для связывания белка-регулятора. Эта же структура оказалась защищенной от химической модификации в результате связывания с комплексом белков *L10* и *L7/L12*.

**Структура регуляторных рибосомных белков.** Наличие белков-регуляторов, способных вследствие связывания со специфическим сайтом мРНК данного оперона блокировать ее трансляцию, стало причиной многочисленных попыток определения структуры мРНК, необходимой для связывания с белком, вызвав интерес и к областям самих регуляторных белков, важных для этого взаимодействия. На основании летального для клеток-хозяев эффекта суперпродукции белка *L10* с делетированными 20 аминокислотными остатками в С-концевой области можно заключить, что данный С-концевой сегмент несуществен для специфического взаимодействия регуляторного *L10* белка с мРНК *rplJ* [39]. При конструировании более протяженных делеций в С-концевой части белка, однако, было установлено, что указанный сегмент представляет собой максимальную порцию белка *L10*, не имеющую значения для «feedback» контроля [40]. Удаление последующих двух аминокислотных остатков Lys<sub>142</sub> и Glu<sub>143</sub> и замена их на Gln сделали белок *L10* перерегуляторноспособным. Делеции, сконструированные нами в N-концевой области, выявили, что регуляторная способность белка *L10* сохраняется при удалении двух и нарушается удалением 11 аминокислотных остатков. Можно, следовательно, предположить, что аминокислоты Lys<sub>142</sub> и Glu<sub>143</sub> являются критическими, и, по-видимому, находятся в сайте белка *L10*, непосредственно вовлеченном во взаимодействие с последовательностью-мишенью на мРНК *rplJ*. Возможно, для такого взаимодействия существенны более чем два N-концевых аминокислотных остатка. Первичная структура нуклеотидов и аминокислот бел-

ков — аналогов *L10* из филогенетически родственных *E. coli* микроорганизмов к настоящему времени не установлена, что делает пока невозможным сравнение доменов белка *L10*, необходимых для регуляторной функции в *E. coli* и близкородственных прокариотах. Показано [29], что белок *L1* *E. coli* может осуществлять аутогенный контроль в оперонах *L11* *S. marcescens* и *P. vulgaris*, гены которых организованы аналогично *E. coli*. Сравнение первичной структуры нуклеотидов и аминокислот выявило большую консервативность первичной структуры *L1* белков *S. marcescens* и *P. vulgaris* в сравнении с *E. coli*. Белки *L1* из этих микроорганизмов могли осуществлять регуляцию трансляции в *rplKA* опероне *E. coli*.

**Сопряженная трансляция бицистронных мРНК *L11-L1* и *L10-L7/L12*.** Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные однозначно свидетельствуют о том, что в полицистронных мРНК, кодирующих синтез рибосомных белков *E. coli*, трансляция дистальных цистронов сопряжена с проксимальными. Благодаря наличию такого механизма становится возможной регуляция трансляции полицистронной мРНК единым белком-репрессором, взаимодействующим с последовательностью-мишенью вблизи области инициации трансляции первого цистрона. Попыты с использованием рекомбинантных плазмид, содержащих гены *L11* оперона под контролем промотора *lac*, показали, что делеции, нарушающие сайт инициации трансляции гена *rplK* (белок *L11*), нарушают и синтез продукта дистального гена *rplA* — белка *L1*. При этом заметного снижения транскрипции мРНК *L11* не происходило [25]. В последующих экспериментах, проведенных с помощью влияющих на трансляцию мРНК *rplKA* мутаций [41], были исследованы характерные ее особенности. В частности, было показано, что сайт инициации трансляции мРНК *L1* обладает всеми элементами, необходимыми для узнавания свободными рибосомами, и в этом смысле является потенциально активным инициаторным сайтом. В плазмиде с амбер-мутацией 27 нуклеотидами выше инициаторного кодона, трансляция дистального цистрона *L1* оказалась более эффективной, чем проксимального цистрона *L11*. Следовательно, в инициации трансляции цистрона *L1* участвовали свободные рибосомы из пула клетки. С другой стороны, делеция в вышележащем районе вплоть до 29-го нуклеотида левее кодона AUG оказывала «демаскирующий эффект», удаление же последующих трех нуклеотидов усилило его еще более. Интересно, что точечные мутации, локализующиеся между позициями 501 и 511, превращали неактивный инициаторный сайт *L1* в активный. Исходя из этого авторы однозначно заключили, что отсутствие необходимых для узнавания рибосомами сигнальных последовательностей не препятствует независимой от проксимального цистрона *L11* инициации трансляции мРНК *L1*. В основе наблюдаемого эффекта лежат структурные особенности бицистронной мРНК, мешающие независимой трансляции мРНК *L1*. При получении точечных мутаций установлено, что в формировании этих особенностей участвуют некоторые основания G.

Несмотря на существование определенных мутаций, приводящих к высокой эффективности независимой инициации трансляции мРНК *L1*, сопряженная трансляция в интактном опероне является механизмом, обеспечивающим высокую эффективность трансляции дистального цистрона и эквимолярное соотношение синтеза белков *L11* и *L1* [41]. Области мРНК, вовлеченные в обеспечение «маскировки» сайта инициации *L1*, были локализованы авторами выше последовательности Шайна — Далгарно цистрона *L1*, т. е. рибосомы, транслирующие вышележащий цистрон *L11*, оказываются очень близко к сайту инициации «демаскированного» цистрона *L1*. Все мутации, полученные в результате действия азотной кислоты и влияющие на трансляционное сопряжение *L11* и *L1* цистронов, размещены в области —25 — —15 относительно кодона ATG *L1* и представляют собой транзиции G→A. Интересно обсуждение авторами [41] возможности участия антисмысловой РНК, комплементарной интергенной области мРНК *rplKA*, в маскировке



сайта инициации трансляции *L1*. Предшествующие опыты по синтезу мРНК *L11-L1* с промотора фага *SP6*, где возможность влияния антисмысловой РНК исключалась, послужили основанием для вывода об отсутствии регуляторной функции антисенс РНК в интактном опероне *rplKA* [41]. В случае трансляции мРНК *rplJL* ясно, что для обеспечения избыточной синтеза белка *L7/L12*, кодируемого вторым геном оперона *rplL*, необходима независимая инициация трансляции мРНК *rplL*. В отличие от небольшого расстояния (3 нуклеотида), разделяющего цистроны *rplK* и *rplA* [6], гены *rplJ* и *rplL* разделены 66 п. о. Однако, как и в случае других оперонов рибосомных белков *E. coli*, трансляция мРНК *rplJL* регулируется взаимодействием репрессорного белка *L10* [31, 32, 42] или комплексом его с белком *L7/L12* [38] и последовательностью-мишенью вблизи сайта инициации трансляции мРНК *L10*. Согласно предположению Сора и др. [41], в данном случае трансляция проксимального цистрона *L10* обеспечивает «демаскировку» сайта инициации трансляции второго цистрона (*L7/L12*), с которым, таким образом, связываются в основном свободные рибосомы из клеточного пула [42]. Сопряженность трансляции в обеих полицистронных мРНК *rplKA* и *rplJL*, результатом которой, однако, является различное соотношение белков, программируемых каждым цистроном в бицистронных мРНК, стала основанием для выделения двух классов трансляционного сопряжения: сопряжения с эквимольным синтезом, как в случае оперона *rplKA*, и последовательной трансляции, для *rplJL* [22].

**Механизмы регуляции, обеспечивающие неэквимольный синтез белков *L10* и *L7/L12*.** Определение первичной структуры кластера генов *rplKAJL E. coli* [6] показало, что области Шайна — Далгарно этих генов содержат последовательности GGAG для генов *rplA* и *rplJ*, и GAGG и AGGA — для генов *rplK* и *rplL* соответственно. Поэтому, по мнению Поста и др. [6], очевидной корреляции между структурой области Шайна — Далгарно и большей эффективностью экспрессии гена *rplL* не существует. Неэквимольный синтез белков *L10* и *L7/L12* стал причиной пристального внимания к внутреннему промотору  $P_{L12}$ , расположенному в интегральной области *rplJL* оперона [43—46, 49]. Конструирование рекомбинантных плазмид для измерения силы промотора  $P_{L12}$  [43, 44, 47], а также данные S1-картирования [49] явились однозначным свидетельством того, что данный промотор не может обеспечить 4-кратного молярного избытка синтезирующегося *L7/L12* рибосомного белка. Исследование механизмов регуляции активности генов *rplJL* путем функционального слияния с геном *lacZ* [47] обнаружило ряд закономерностей. При транскрипции генов *rplJ'-lacZ* и *rplL'-lacZ* с промотора одинаковой силы активность  $\beta$ -галактозидазы, обеспечиваемая первым геном, была в 5—10 раз ниже, чем для второго гена. Превосходство экспрессии гена *rplL'-lacZ* увеличивалось с увеличением длины 5'-концевого фрагмента гена *rplL*, присоединяемого к *lacZ*. Для наиболее коротких фрагментов *rplJ* и *rplL*, сливаемых с *lacZ*, превосходство уровня экспрессии гена *rplL* также сохранялось, становясь, однако, менее значительным. Полученные данные дали основание предположить, что 4-кратный избыток белка *L7/L12* может обеспечиваться более эффективной трансляцией мРНК *rplL*. Такое отличие в эффективности трансляции может быть прямым следствием влияния вторичной структуры мРНК, эта возможность исследуется нами в настоящее время.

В последние годы появилось много данных о регуляции активности прокариотических генов *in vivo* антисмысловой РНК [48]. С этой точки зрения представляется интересным изучение такой возможности для *rplJL* оперона *E. coli*, в частности для обеспечения неэквимольного синтеза продуктов генов *rplJ* и *rplL*. Сконструированные нами рекомбинантные плазмиды, продуцирующие антисенс *rplJ* РНК, показали, что снижение экспрессии гена *rplJ* под влиянием антисмысловой РНК возможно, но требует большого избытка ее по сравнению со смысловой

РНК. Учитывая такое требование для модуляции уровня экспрессии гена *rplJ* с помощью антисенс РНК в интактном опероне *rplJL E. coli*, последний должен содержать промотор с эффективностью, не меньшей, чем  $P_{L10}$  и инициирующий транскрипцию в противоположном ему направлении.

Анализ продуктов транскрипции в *rplJL* опероне свидетельствует об отсутствии гетерогенности 3'- и 5'-концов бицистронной мРНК *L10-L7/L12* [49]. Это дает основание полагать, что избыточный синтез белка *L7/L12* не является результатом большей стабильности кодирующего его цистрона мРНК по сравнению с цистроном *L10*.

**Транскрипционный контроль экспрессии генов *rplKAIL-rpoBC*.** Изучение регуляции транскрипции генов «*gif*»-области хромосомы *E. coli* в настоящее время позволяет сделать некоторые окончательные выводы. Исследование продуктов транскрипции в кластере генов *rplKAIL-rpoBC*, проведенное Даунингом и Деннисом [49], основывалось на тщательном картировании транскриптов с помощью S1-нуклеазы. Результаты его показали, что наиболее обильным является тетрацистронный транскрипт генов *rplKAIL* величиной 2660 нуклеотидов. Менее обильны бицистронные транскрипты *rplKA* и *rplJL* протяженностью примерно 1300 нуклеотидов, инициируемые соответственно промоторами  $P_{L11}$  и  $P_{L10}$ . Инициации транскрипции в интергенной области *rplJL*, содержащей промотор  $P_{L12}$ , не обнаружено. Сравнение эффективности промоторов, расположенных в кластере генов *rplKAIL-rpoBC*, путем конструирования рекомбинантных плазмид показало, что наиболее эффективным в ней является промотор  $P_{L11}$ , который на 35 % превосходит по силе  $P_{L10}$  [43]. Минорные промоторы  $P_{L12}$ ,  $P_{\beta}$  и  $P_{\beta'}$  значительно уступают по эффективности основным, которая в случае  $P_{L12}$  составляет лишь 8 % в сравнении с  $P_{L10}$  [44]. Биологическое значение минорных промоторов окончательно не выяснено.

Экспериментально доказано [50], что промотор  $P_{L10}$  в присутствии вышележащего промотора  $P_{L11}$  не проявляет своей максимальной эффективности. Аналогично этому, в «*src*»-опероне низлежащий промотор не функционирует в полную силу при наличии промотора «*src*» [1]. Данное явление получило название промоторной «окклюзии».

Интергенное пространство, разделяющее *rplL* и *rpoB* гены, содержит аттенюатор транскрипции и последовательность, узнаваемую РНКазой III при процессинге мРНК [11]. Большинство транскриптов терминируется в интергенной области *rplL-rpoB*, примерно на 72 нуклеотида ниже гена *rplL* [51]. На эффективность терминирования транскрипции аттенюатором оказывают влияние продукты генов *Rho* и *nusA*. Экспериментально такая терминирование подтверждена S1-картированием и секвенсом транскрипта, 3'-конец которого расположен на 69 п.о. ниже *rplL* [51]. 20 % транскриптов продолжают через аттенюатор, частота терминирования зависит от ряда факторов [52—54]. Аттенюатор транскрипции снижает на 80 % транскрипцию низлежащего гена *rpoB* по сравнению с геном *rplL* [45], обеспечивая таким образом соотношение синтеза рибосомных белков, кодируемых генами *rplJL*, и субъединиц  $\beta$  и  $\beta'$  РНК-полимеразы, равное 1 : 4 : 0,2 : 0,2 [1]. Транскрипты, не терминируемые аттенюатором, подвергаются впоследствии процессингу РНКазой III. Помимо регуляции уровней экспрессии генов «*gif*»-оперона предполагается возможное участие аттенюатора в модуляции степени эффективности терминирования, позволяющее клетке привести количества РНК-полимеразы в соответствие с физиологически необходимым для оптимальной транскрипционной способности [11]. Делеции аттенюатора привели к существенному увеличению транскрипции гена  $\beta$ -субъединицы [11]. Установлено [55], что рифампицин, частично ингибируя общий синтез РНК, оказывает сильный стимулирующий эффект на транскрипцию генов *rpoBC*, при этом лишь незначительно активируя транскрипцию соседствующих генов *rplKAIL*. Детальное исследование механизма действия рифампицина привело к заключению о том, что он вызывает транскрипцию через терминатор-

содержащие последовательности. Методом слияния с геном *lac* участков «*rif*»-области было показано наличие минорного промотора  $P_{\beta}$ , а также дополнительного терминатора транскрипции, разделяющего опероны *rplKA* и *rplJL* [55].

**Аутогенная регуляция синтеза  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц РНК-полимеразы.** Многочисленные эксперименты, проведенные *in vivo* и *in vitro*, показали, что синтез  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц РНК-полимеразы регулируется аутогенно. На основании изучения мутантов, дефектных по сборке голофермента РНК-полимеразы, было высказано предположение о том, что регуляция синтеза субъединиц РНК-полимеразы может контролироваться голоферментом или промежуточным продуктом сборки  $\alpha_2\beta$ . С помощью конструирования рекомбинантных плазмид было исследовано влияние ряда факторов, в том числе делеций, в интергенной области *rplL-rpoV* на экспрессию гена *rpoV*. Делеции последовательностей, окружающих сайт процессинга РНКазой III, приводили к 80—90 %-ному снижению эффективности трансляции мРНК  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы. Сам по себе процессинг мРНК не оказывал влияния на уровень экспрессии гена *rpoV*. Уровень транскрипции мРНК гена *rpoV* не отличался в штамме, дефектном по активности РНКазы III, и штамме дикого типа. Таким образом, было показано, что область, расположенная между нуклеотидами 2729 и 2890, необходима для эффективной трансляции мРНК  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы. Предполагается [11], что данная последовательность может участвовать в формировании структуры мРНК, необходимой для связывания с рибосомой и инициации трансляции в  $\beta$ -цистроне, а также для снижения эффективности этой трансляции в случае, когда  $\beta$ -субъединица продуцируется в количестве, превосходящем необходимое для сборки РНК-полимеразы.

В отношении оперонов, кодирующих рибосомные белки, предполагается, что эффективная трансляция полицистронной мРНК достигается за счет сопряженности трансляции дистальных и проксимальных цистронов [7]. Делеция, сконструированная Деннисом [11], приблизила участок связывания рибосомы  $\beta$ -цистрона к концу цистрона *L12*. Несмотря на близость (25 нуклеотидов) только 20 % рибосом, транслирующих мРНК, *L12* были способны к инициации и завершению трансляции цистрона  $\beta$ -субъединицы. Видимо, для трансляционного сопряжения цистронов *L12* и  $\beta$  потребовалось бы меньшее разделяющее их пространство. В экспериментах Мика и Хэйворда [12] получено прямое доказательство аутогенной регуляции генов *rpoBC* *E. coli in vivo*. Слияние генов *rpoBC* с сильным контролируемым промотором  $P_L$  фага  $\lambda$  показало, что удаление последовательности ДНК вплоть до 26 п. о. перед геном *rpoV* не влияет на посттранскрипционную аутогенную регуляцию синтеза  $\beta\beta'$ . Сверхпродукция  $\beta\beta'$  также аутогенно регулирует синтез  $\beta$ -полипептида, кодируемого геном хромосомы, что выявлено при использовании двух штаммов, имеющих мутации в гене *rpoV*, обуславливающих разную электрофоретическую подвижность  $\beta$ -полипептида. При картировании с помощью S1-нуклеазы обнаружено, что эта регуляция осуществляется посттранскрипционно, а также, что синтез мРНК- $\beta$ , контролируемый фагом, превосходил количество мРНК- $\beta$ , определяемое геном *rpoV* хромосомы, в 20 раз. Избыток  $\beta$ -субъединицы в клетке приводил к ауторегуляции синтеза  $\beta$ , но не  $\beta'$ , говоря таким образом об их независимой регуляции. Синтез субъединиц РНК-полимеразы также контролируется посттранскрипционно. Например, экспрессия генов *rpoBC* с плазмиды под контролем промотора  $P_{L10}$  обеспечивает увеличение количества мРНК *rpoBC* в 7 раз, в то же время синтез  $\beta\beta'$ -субъединиц возрастает всего лишь в 2 раза [12, 30]. Удаление последовательностей ДНК из дистальной порции интергенной области *rplJL-rpoV* уменьшает эффективность экспрессии *rpoBC* и влияет на посттранскрипционный аутогенный контроль [11].

Ясно, что синтез РНК-полимеразы контролируется на нескольких уровнях (транскрипционно и посттранскрипционно) через механизмы,

включающие аттенуацию, трансляционный «feedback» и, возможно, положительный регулятор [56].

В рекомбинантном фаге  $\lambda$ , где гены *rpoBC* присоединялись к гетерологичному промотору  $P_L$ , была удалена большая область интергенного пространства *rplL-rpoB*, содержащая промоторы, аттенуатор и большую часть регуляторных последовательностей ДНК выше гена *rpoB*. Индукция лизогена привела к 2—3-кратному увеличению синтеза  $\beta$ ,  $\beta'$ -субъединиц, в то же время количество мРНК- $\beta\beta'$  увеличилось примерно в 20 раз. Таким образом, удаление данной порции интергенной области не нарушило посттранскрипционного контроля *rpoBC* генов, содержащихся в фаге. По-видимому, все или по крайней мере большинство «feedback»-регуляторных последовательностей расположены ниже сайта узнавания *SalGI*, вблизи инициаторного кодона *rpoB*. Это не соответствует данным Денниса [11], который пришел к заключению, что последовательности, окружающие сайт процессинга РНКазой III, выше *rpoB*, необходимы для эффективной трансляции мРНК *rpoB*. В экспериментах Мика и Хэйворда [12] удаление данных последовательностей не изменило уровня экспрессии гена *rpoB*. Возможно, что расхождение экспериментальных данных обусловливается принадлежностью исследуемых генов *rpoBC* фаговой ДНК. Из анализа регуляции синтеза рибосомных белков [3, 11] предполагается, что основными регуляторными мишенями являются участок связывания рибосомы и AUG кодон. Использование штаммов с электрофоретически отличными подвижностями  $\beta$ -полипептидов позволило прямым образом оценить влияние увеличения концентрации  $\beta$  ( $\beta'$ ) на уровень экспрессии хромосомного *rpoB* аллеля. Избыток  $\beta\beta'$  не вызывал заметных изменений в транскрипции *rpoB* или близлежащих генов рибосомных белков, позволяя авторам [12] заключить, что регуляция *rpoB* гена хромосомы, как и предполагалось из предшествующих опытов, является посттранскрипционной [11, 30, 57, 58]. Избыточное количество  $\beta$  повлияло на синтез только лишь  $\beta$ , но не  $\beta'$ -субъединицы, кодируемой хромосомным геном, что соответствует данным Денниса [11]. Поскольку  $\beta'$  регулируется посттранскрипционно, авторы заключили, что должно быть по крайней мере две регуляторные молекулы, контролирующие независимый синтез  $\beta$  и  $\beta'$ . По-видимому, сама по себе  $\beta$  или комплекс определенных субъединиц РНК-полимеразы, возможно, и не содержащий  $\beta'$ -субъединицы, может снижать синтез  $\beta$ -полипептида, не влияя при этом на синтез полипептида  $\beta'$  [12].

**Особенности рекомбинантных ДНК, обусловленные регуляцией экспрессии клонируемых генов.** Следствием жесткой координированной регуляции синтеза рибосомных белков явились проблемы, связанные с клонированием кодирующих их генов [36, 39, 59, 60]. Многочисленные эксперименты по клонированию генов и оперонов рибосомных белков показали, что повышенный уровень экспрессии генов регуляторных рибосомных белков летален для клеток-хозяев. Это обусловило, например, невозможность получения рекомбинантных плазмид, содержащих ген *rplJ* под контролем собственного промотора  $P_{L10}$ , на основе плазмиды *pBR322* [36]. Клонирование соответствующей порции ДНК в плазмиде *pUC19* было возможным в единственной ориентации, включающей участие  $P_{lac}$  вектора в транскрипции ДНК-вставки [60—62]. Поддержание рекомбинантной плазмиды, где экспрессия гена *rplJ* на низком уровне, обеспечиваемом транскрипцией структурной части гена с неиндуцированного *lac*-промотора, оказалось возможным. Сравнение уровней экспрессии, проведенное определением активности  $\beta$ -галактозидазы, кодируемой гибридным геном *rplJ'-lacZ'* в плаزمиде *pUC*, выявило следующее. Летальный для клеток-хозяев и обеспечиваемый  $P_{lac}+P_{L10}$  уровень экспрессии гена *rplJ* равнялся 200—300 ед. Миллера. Уровень же экспрессии этого гена при спонтанной неиндуцированной ИПТГ транскрипции с промотора *lac* соответствовал примерно 1 ед. Миллера. Такой же уровень был допустимым и для гена *rplA*, кодирующего регуляторный рибосомный белок *L1*. Невозмож-

ность сверхпродукции, по-видимому, обусловила и единственно возможную, встречную  $P_{lac}$ , ориентацию при клонировании в  $pUC$  полных оперонов  $rplKA$  и  $rplJL$  [40]. Интересно, что, несмотря на предполагаемую регуляцию по принципу обратной связи для генов  $rpoBC$ , сверхпродукция  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы в *E. coli* оказывается возможной [3]. Известно, что клонирование гена, кодирующего токсичный для клеток-хозяев продукт, обычно сопровождается нестабильностью рекомбинантных конструкций. Полученные нами рекомбинантные фаги  $M13$ , содержащие гены  $rplJL$ ,  $rpoBC'$  под контролем промоторов  $P_{L10}$  и одностороннего промотора  $P_{lac}$  вектора, имели низкую стабильность, которую удалось существенно повысить снижением транскрипции и, следовательно, экспрессии встроенных генов путем разделения промоторов  $P_{lac}$  и  $P_{L10}$  терминаторами транскрипции или удалением промотора  $lac$  из состава векторного фага [64, 65]. Эти данные позволяют предположить, что помимо жесткой регуляции экспрессии генов внутри оперонов  $rplKA$  и  $rplJL$  экспрессия данных генов находится в более сложной координированной регуляции с другими генами — оперонами *E. coli*, которая нарушается в результате сверхэкспрессии отдельных из них, например  $rplKA$  и  $rplJL$  [40]. Повышенный уровень продукции белка  $L7/L12$  оказался возможным в *E. coli*, не сопровождаемая отрицательными эффектами [40].

#### REGULATION MECHANISMS OF GENE EXPRESSION IN THE $rplKAJL$ - $rpoBC$ CLUSTER OF *ESCHERICHIA COLI*

*E. B. Paton*

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

Mechanisms regulating expression of genes in the  $rplKAJL$ - $rpoBC$  cluster of *E. coli* at transcriptional and translational levels are discussed. As well as the functional role of mRNA structure, structure of regulatory ribosome proteins, translation coupling in polycistronic mRNA encoding these proteins, transcription control in the «rif»-region and autogenous regulation of the RNA-polymerase  $\beta$ - and  $\beta'$ -subunits synthesis as well as design peculiarities of recombinant DNA related to expression of these genes.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jinks-Robertson S., Nomura M. Ribosomes and tRNA // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* molecular and cellular biology.—New York: Amer. Soc. Microbiol., 1987.—P. 1358—1385.
2. Lindahl L., Zengel J. M. Ribosomal genes in *Escherichia coli* // Ann. Rev. Genet.—1986.—20.—P. 297—326.
3. Nomura M., Gourse R., Baughman G. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components // Ann. Rev. Biochem.—1984.—53.—P. 75—118.
4. Tittawella I. P. B. Evidence for clustering of RNA polymerase and ribosomal protein genes in six species of *Enterobacteria* // Mol. and Gen. Genet.—1984.—195, N 1.—P. 215—218.
5. Nomura M., Post L. E. Organization of ribosomal genes and regulation of their expression in *E. coli* // Ribosomes: structure, function and genetics / Eds G. Chambliss, G. R. Davies, G. R. Craven et al.—Baltimore: Univ. Park press, 1980.—P. 671—691.
6. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit  $\beta$  in *Escherichia coli* / L. E. Post, G. D. Strycharz, M. Nomura et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76.—P. 1697—1701.
7. Nomura M. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components in *Escherichia coli*: translational regulation and feedback loops // Symp. of the Soc. for general microbiology. Regulation of gene expression / Eds I. Booth, C. Higgins.—Cambridge: Univ. press, 1986.—P. 199—220.
8. Gourse R. L., Sharrock R. A., Nomura M. Control of ribosome synthesis in *Escherichia coli* // Structure, function and genetics of ribosomes / Eds B. Hardesty, G. Kramer.—New York: Springer, 1985.—P. 766—788.
9. Dennis P. P. *In vivo* stability, maturation and relative differential synthesis rates of individual *r*-proteins in *Escherichia coli* *B/r* // J. Mol. Biol.—1974.—88, N 1.—P. 25—41.
10. Expression of ribosomal protein genes cloned in a hybrid plasmid in *Escherichia coli*: gene dosage effects on synthesis of ribosomal proteins and ribosomal protein

- messenger ribonucleic acid / A. M. Fallon, C. S. Jinks, M. Yamamoto, M. Nomura // J. Bacteriol.—1979.—138, N 1.—P. 383—396.
11. Dennis P. P. Site specific deletions of regulatory sequences in a ribosomal protein-RNA polymerase operon in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 10.—P. 3202—3209.
  12. Meek W. D., Hayward R. S. Direct evidence for autogenous regulation of the *Escherichia coli* genes *rpoBC* in vivo // Mol. and Gen. Genet.—1986.—202, N 3.—P. 500—508.
  13. Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: structural homology of ribosomal RNA and ribosomal protein mRNA / M. Nomura, J. L. Yates, D. Dean, L. E. Post // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77.—P. 7084—7088.
  14. Maaløe O. An analysis of bacterial growth // Develop. Biol. supplement.—1969.—3.—P. 33—58.
  15. Gausing K. Regulation of ribosome biosynthesis in *E. coli* // Ribosomes: structure, function and genetics / Eds G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies et al.—Baltimore: Univ. press, 1980.—P. 693—718.
  16. Maaløe O. Regulation of protein-synthesizing machinery-ribosomes, tRNA, factors and so on // Biol. regul. and develop. / Ed. R. F. Goldberger.—New York: Plenum press, 1979.—V. 1.—P. 487—542.
  17. Growth-rate dependent regulation of ribosome synthesis in *E. coli*: expression of the *lacZ* and *galK* genes fused to ribosomal promoters / A. Miura, J. H. Krueger, S. Itoh et al. // Cell.—1981.—25, N 3.—P. 773—782.
  18. Gourse R. L., Sharrock R. A., Nomura M. Control of ribosome synthesis in *E. coli* // Ribosomes: structure, function and genetics / Eds B. Hardesty, G. Kramer.—New York: Springer, 1985.—P. 766—788.
  19. Parsons G. D., Mackie G. A. Expression of the gene for ribosomal protein S20: effects of gene dosage // J. Bacteriol.—1983.—154, N 1.—P. 152—160.
  20. Singer P., Nomura M. Stability of ribosomal protein mRNA and translational feedback regulation in *Escherichia coli* // Mol. and Gen. Genet.—1985.—199, N 3.—P. 543—546.
  21. Yamamoto M., Lindahl L., Nomura M. Synthesis of ribosomal RNA in *E. coli*: analysis using deletion mutants of a  $\lambda$  transducing phage carrying ribosomal RNA genes // Cell.—1976.—7, N 1.—P. 179—190.
  22. Yates J. L., Nomura M. Feedback regulation of ribosomal protein synthesis in *E. coli*: localization of the mRNA target sites for repressor action of ribosomal protein L1 // Ibid.—1981.—24, N 1.—P. 243—249.
  23. The secondary structure of the protein L1 binding region of ribosomal 23S RNA. Homologies with putative secondary structures L11 mRNA and of a region of mitochondrial 16S rRNA / C. A. Branlant, A. Krol, A. Machatt, J.-P. Ebel // Nucl. Acids Res.—1981.—9, N 1.—P. 293—307.
  24. Specific binding of prokaryotic ribosomal protein to a eukaryotic ribosomal RNA: implication for evolution and autoregulation / R. L. Gourse, D. L. Thurlow, S. A. Gerbi, R. A. Zimmerman // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78.—P. 2722—2726.
  25. Baughman G., Nomura M. Localization of the target site for translational regulation of the L11 operon and direct evidence for translational coupling in *Escherichia coli* // Cell.—1983.—34, N 3.—P. 979—988.
  26. Baughman G., Nomura M. Translational regulation of the L11 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: analysis of the mRNA target site using oligonucleotide-direct mutagenesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1984.—81.—P. 5389—5393.
  27. Thomas M. S., Nomura M. Translational regulation of the L11 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: mutations that define the target site for repression by L1 // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 7.—P. 3085—3095.
  28. Kearney K. R., Nomura M. Secondary structure of the autoregulatory mRNA binding site of ribosomal protein L1 // Mol. and Gen. Genet.—1987.—210, N 1.—P. 66—68.
  29. Sor F., Nomura M. Cloning and DNA sequence determination of the L11 ribosomal protein operon of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris*: translational feedback regulation of the *Escherichia coli* L11 operon by heterologous L1 proteins // Ibid.—P. 52—59.
  30. Dennis P. P., Fitt N. P. Transcriptional and posttranscriptional control of RNA polymerase and *r*-protein genes cloned on composite *ColE1* plasmids // J. Biol. Chem.—1979.—254, N 15.—P. 7540—7547.
  31. Brot N., Caldwell D., Weissbach H. Autogenous control of *Escherichia coli* ribosomal protein L10 synthesis in vitro // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77.—P. 2592—2595.
  32. Fukuda R. Autogenous regulation of the synthesis of ribosomal proteins, L10 and L7/L12, in *Escherichia coli* // Mol. and Gen. Genet.—1980.—178, N 3.—P. 483—486.
  33. *E. coli* ribosomal protein L10 inhibits translation of L10 and L7/L12 mRNAs by acting at a single site / J. L. Yates, D. Dean, W. A. Strycharz, M. Nomura // Nature.—1981.—294, N 5838.—P. 190—192.
  34. Translational control of ribosomal protein L10 synthesis occurs prior to formation of first peptide bond / N. Robakis, L. Meza-Basso, N. Brot, H. Weissbach // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78.—P. 4261—4264.

35. Friesen J. D., Tropak M., An G. Mutations in the *rplJ* leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // *Cell*.—1983.—32, N 2.—P. 361—369.
36. Post-transcriptional regulatory mutants in ribosomal protein-RNA polymerase operon of *E. coli* / N. Fiil, J. D. Friesen, W. L. Downing, P. P. Dennis // *Ibid.*—1980.—19, N 3.—P. 837—844.
37. RNA secondary structure and translation inhibition: analysis of mutants in the *rplJ* leader / T. Christensen, M. Johnsen, N. P. Fiil, J. D. Friesen // *EMBO J.*—1984.—3, N 7.—P. 1609—1612.
38. Climie S. C., Friesen J. D. Feedback regulation of the *rplJL-rpoBC* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure // *J. Mol. Biol.*—1987.—193, N 3.—P. 371—381.
39. Friesen J. D., An G. The lethal effect of a plasmid resulting from transcriptional readthrough of *rplJ* from the *rplKA* operon in *Escherichia coli* // *Mol. and Gen. Genet.*—1983.—189, N 2.—P. 275—281.
40. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Однонаправленная ориентация при клонировании фрагментов *rplKAL-rpoBC* оперона *Escherichia coli* в многокопийной плазмиде *pUC* // *Биополимеры и клетка*.—1989.—5, № 1.—С. 58—66.
41. Sor F., Bolotin-Fukuhara M., Nomura M. Mutational alterations of translational coupling in the *L11* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*—1987.—169, N 8.—P. 3495—3507.
42. Yates J. L., Arfsten A. E., Nomura M. *In vitro* expression of *Escherichia coli* ribosomal protein genes: autogenous inhibition translation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77.—P. 1837—1841.
43. Ralling G., Linn T. Relative activities of the transcriptional regulatory sites in the *rplKAL-rpoBC* gene cluster of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*—1984.—158, N 1.—P. 279—285.
44. An G., Friesen J. D. Characterization of promoter-cloning plasmids: analysis of operon structure in the *rif* region of *Escherichia coli* and isolation of an enhanced internal promoter mutant // *Ibid.*—1980.—144, N 3.—P. 904—916.
45. Barry G., Squires C. L., Squires C. Control features within the *rplJL-rpoBC* transcriptional unit of *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76, N 10.—P. 4922—4926.
46. Крупская И. В., Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Внутренний промотор *rplJL* оперона *Escherichia coli* проявляет высокую эффективность в рекомбинантной плазмиде *pNM481* // *Генетика*.—1989.—25, № 1.—С. 154—157.
47. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Изучение регуляции экспрессии гена *rplJ* *Escherichia coli* методом слияния с геном *lacZ* в плазмиде *pNM481* // *Биополимеры и клетка*.—1989.—5, № 2.—С. 99—102.
48. Inouye M. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation—a review // *Gene*.—1988.—72, N 1—2.—P. 25—34.
49. Downing W. D., Dennis P. P. Transcription products from the *rplKAL-rpoBC* gene cluster // *J. Mol. Biol.*—1987.—194, N 4.—P. 609—620.
50. Morgan B., Hayward R. S. S1 analysis of  $P_{L10}$  activity in the *E. coli* *rpoBC* operon after aminoacyl-tRNA limitation or rifampicin treatment // Sequence specificity in transcription and translation.—New York: Alan R. Liss, 1985.—P. 31—40.
51. Ralling G., Linn T. Evidence that *Rho* and *NusA* are involved in termination in the *rplL-rpoB* intergenic region // *J. Bacteriol.*—1987.—169, N 5.—P. 2277—2280.
52. Blumenthal R. M., Dennis P. P. Regulation of ribonucleic acid polymerase synthesis during restriction of an *Escherichia coli* mutant, temperature sensitive for transcription factor sigma // *Ibid.*—1980.—142, N 3.—P. 1049—1054.
53. Farnham P. J., Greenblatt J., Platt T. Effects of *NusA* protein on transcription termination in the tryptophan operon of *Escherichia coli* // *Cell*.—1982.—29, N 3.—P. 945—951.
54. Maher D. L., Dennis P. P. *In vivo* transcription of *E. coli* genes coding for rRNA ribosomal proteins and subunits of RNA polymerase: influence of the stringent control system // *Mol. and Gen. Genet.*—1977.—155, N 3.—P. 203—211.
55. Effect of rifampicin on *lacZ* fused to promoters or terminators of the *E. coli* *rpoBC* operon / K. M. Howe, A. J. Newman, I. Carner et al. // *Nucl. Acids Res.*—1982.—10, N 22.—P. 7425—7438.
56. Tittawella I. P. B. Rifampicin induced protein synthesis: a prerequisite for increased expression of the  $\beta\beta'$  operon in *Escherichia coli* // *Mol. and Gen. Genet.*—1976.—146, N 1.—P. 79—83.
57. Kirschbaum J. B., Scaife J. G. Evidence for a  $\lambda$  transducing phage carrying the genes for the  $\beta$  and  $\beta'$  subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase // *Ibid.*—1974.—132, N 3.—P. 193—201.
58. Dennis P. P., Nene V., Glass R. E. Autogenous post-transcriptional regulation of RNA polymerase  $\beta$  and  $\beta'$  synthesis in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*—1985.—161, N 2.—P. 803—806.
59. Expression of *Escherichia coli* ribosomal protein and RNA polymerase genes on plasmids / N. P. Fiil, D. Bendiak, J. Collins, J. D. Friesen // *Mol. and Gen. Genet.*—1979.—173, N 1.—P. 39—50.
60. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Особенности клонирования фрагментов *rpoBC* оперона *Escherichia coli* в плаزمиде *pUC* // *Биополимеры и клетка*.—1987.—3, № 6.—С. 307—312.

61. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Ориентационные эффекты, вызываемые присутствием в плазмиде *pUC* фрагментов *rplJL-гpoBC*-оперона *Escherichia coli* // Там же.— 1988.—4, № 3.— С. 163—167.
62. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Возможность клонирования гена регуляторного белка *rplJL* оперона *Escherichia coli* в высококопийной плазмиде *pUC* обеспечивается конвергентной транскрипцией, инициируемой промотором *P<sub>lac</sub>* вектора // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1989.— № 3.— С. 39—43.
63. *Overexpression and purification of a biologically active rifampicin-resistant  $\beta$  subunit of Escherichia coli RNA polymerase* / J. D. McKinney, J. Lee, R. E. O'Neill, A. Goldfarb // Gene.— 1987.—58, N 1.— P. 13—18.
64. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Однонаправленная ориентация гена *гpoB* *E. coli* при клонировании в нитевидные фаги *M13mp8* и *M13mWB2348* // Биорг. химия.— 1984.—10, № 11.— С. 1544—1547.
65. Патон Е. Б., Вудмаска М. И., Свердлов Е. Д. Присутствие собственного промотора *гpoB* гена снижает стабильность рекомбинантных однонитевых фагов, содержащих этот ген // Биополимеры и клетка.— 1985.—1, № 3.— С. 160—162.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 11.05.89