

И. В. Крупская, Е. Б. Патон

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОСТТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОКАРИОТ

Данный обзор содержит разделы, посвященные некоторым ключевым молекулярным механизмам посттранскрипционного контроля экспрессии генов. Рассматриваются процессы деградации мРНК, участие REP-последовательности в регуляции экспрессии генов, а также детерминанты экспрессии на уровне инициации трансляции: последовательность Шайна — Далгарно, расстояния от нее до инициаторного кодона, инициаторный и второй кодоны, редкие кодоны.

Вопрос о способах регуляции экспрессии генов является ключевым в современной молекулярной биологии как в теоретическом, так и в прикладном аспекте. В последнее время наши знания о разнообразии природных механизмов регуляции экспрессии генов стремительно пополняются. Экспрессия генов в *Escherichia coli* определяется в первую очередь эффективностью сигналов инициации транскрипции и трансляции. Предмет данного обзора составляет исследование разнообразных механизмов посттранскрипционного контроля экспрессии генов.

Роль стабильности мРНК в регуляции экспрессии. Стабильность матричной РНК играет важную роль в определении уровней белкового синтеза у про- и эукариот. Постоянный уровень функционирующей в клетке мРНК обусловлен скоростью ее распада. Следовательно, этот процесс важен при контроле экспрессии генов. Обычно уровень синтеза белка зависит от концентрации кодирующей его мРНК, которая, в свою очередь, определяется соотношением между скоростями ее синтеза и распада.

Виды индивидуальных мРНК значительно отличаются по стабильности. В клетках млекопитающих мРНК временно экспрессирующихся генов (например, *c-fos* и *c-myc*) имеет период полужизни ($t_{1/2}$) 15 мин, в то время как другие (такие как β -глобиновая мРНК) более стабильны. В отличие от эукариотических, бактериальные мРНК распадаются довольно быстро. Обычно период полужизни их равен 2—3 мин, хотя некоторые виды более стабильны. У мРНК *E. coli* период полужизни составляет от нескольких секунд до 30 мин [1].

Различный уровень бактериальных матриц в живой клетке обусловлен разной чувствительностью их к деградации клеточными эндонуклеазами и 3'-экзонуклеазами, активность которых зависит от последовательности и структуры мРНК. Рибосомы и антисенс-РНК также способны влиять на стабильность транскриптов, с которыми они взаимодействуют. Отличия в стабильности матрицы могут приводить к различной экспрессии генов внутри полицистронных оперонов и к модуляции экспрессии генов в ответ на изменения условий роста [2]. Мутации, вызывающие понижение стабильности мРНК, возможно, таким образом снижают экспрессию гена, повышение же стабильности матрицы увеличивает уровень белкового синтеза [3, 4].

В наибольшей степени стабильность мРНК *in vivo* зависит от действия природных нуклеаз, которые хорошо изучены в *E. coli* и других бактериях [5]. Рибонуклеазы, причастные к распаду мРНК, можно разделить на две категории: эндонуклеазы и экзонуклеазы.

Только две эндонуклеазы: РНКазы III (продукт гена *rnc*) и РНКазы E (продукт гена *rne*) способны подвергать деградации матричную РНК [2, 6]. РНКазы III специфично действуют на двунитчатую РНК и узнают определенные длиннопетлевые структуры, расщепляя одну, а иногда и обе цепи [7]. Посредством РНКазы III положительно регулируется экспрессия генов фага T7 [8] и гена *cIII* фага лямбда [9], отрицательно — экспрессия гена *cII* фага лямбда [10]. РНКазы III предположительно участвуют в процессинге транскриптов генов, контролируемых антисенс-РНК [10, 11], а также, как показано, в укорочении (*trimming*) *dicF*-РНК *E. coli* и в процессинге транскриптов, кодирующих белки 33b, 59 и 32 фага T4 [6].

Расщепление РНКазой III в участках, которые могут образовывать вторичную структуру, является лимитирующим этапом в распаде транскриптов *rpsO-pnp* [12], *rnc-era* [13] и *metY-nusA-infB* [14] оперонов *E. coli* и *inf*-гена фага лямбда [15]. Помимо участия в деградации мРНК, РНКазы III способствуют процессингу как рРНК, так и мРНК [16]. При исследовании оперона S15 рибосомного белка *E. coli* обнаружено участие РНКазы III в деградации мРНК [6] и, следовательно, в контроле экспрессии генов. Транскрипты *rpsO-pnp*-оперона *E. coli* (гены кодируют рибосомный белок S15 и полинуклеотидфосфорилазу) процессируются в четырех сайтах в межцистронной области длиной 249 нуклеотидов. Начальный этап процессинга *pnp* РНК осуществляется РНКазой III, расщепляющей РНК в двух сайтах выше гена *pnp*. Расщепление в двух других сайтах зависит от аллели дикого типа гена *rne*, кодирующего эндонуклеолитический фермент РНКазу E. Расщепления происходят на расстоянии 37 нуклеотидов от основания шпильки р-зависимого аттенюатора, расположенного ниже гена *rpsO*. Расщепление ниже аттенюатора способствует образованию *rpsO*-мРНК, почти идентичной моноцистронному аттенюированному транскрипту, выше аттенюатора транскрипции — образованию мРНК *rpsO*, у которой отсутствует 3'-концевая шпилечная структура. Быстрая деградация процессированной мРНК в *rne*⁺-штамме по сравнению с медленной деградацией транскрипта, аккумулирующегося в *rne*⁻-штамме, предполагает, что РНКазы III инициирует распад *rpsO*-мессенджера в результате удаления стабилизирующей шпильки на 3'-конце РНК.

РНКазы E была найдена как фермент, непосредственно участвующий в созревании рибосомной РНК и расщепляющий однонитчатые РНК внутри последовательности, расположенной выше длиннопетлевой структуры [17]. Очень интересна роль РНКазы E в природной регуляции экспрессии. Процессинг мРНК гена 32 РНКазой E стабилизирует мессенджер 32, но в то же время ускоряет распад вышележащего участка мРНК [17, 18]. Более того, многие транскрипты фага T4 стабилизируются в штамме, дефектном по РНКазе E [19]. РНКазы E участвует в созревании рибосомной 5S РНК и расщепляет РНК I плазмиды *ColE1* [20]. Другие эндонуклеолитические расщепления, происходящие в 5'-лидерной области гена и в рибосом-связывающем участке, также влияют на стабильность мРНК и экспрессию генов [21].

Недавно открыта эндорибонуклеаза K (РНКазы K — *Escherichia coli*) [22], катализирующая сайт-специфическое расщепление транскриптов генов *ompA* и *bla* в 5'-области. Действие РНКазы K, в частности, инициация деградации мРНК, может быть одним из природных механизмов регуляции экспрессии генов.

Логично предположить, что если распад мРНК произошел благодаря случайному эндонуклеолитическому расщеплению, то он должен зависеть от размера и степени доступности внутринуклеотидных звеньев. Однако, по крайней мере у прокариот, не наблюдается корреляции между размером мРНК и скоростью ее распада [23]. Транскрипты, отличающиеся размером на 50 %, имеют сходную скорость распада.

Две экзонуклеазы: полинуклеотидфосфорилаза (продукт гена *pnp*) и РНКазы II (продукт гена *rnb*) — ферменты, ответственные за деградацию матричной РНК до мононуклеотидов [24, 25]. Они проявляют

5'-3'-экзонуклеазную активность и разрушают мРНК с 3'-конца. РНКазы II и полинуклеотидфосфорилаза являются основными экзонуклеазами, вовлеченными в деградацию мРНК, и не определяют скорости распада большинства матриц. Возможно, существует взаимосвязь между стабильностью мРНК и процессом транскрипции, например, в том случае, если цепи мРНК хоть как-нибудь защищены от влияния неспецифических эндонуклеаз, но чувствительны к экзонуклеазам. Определенная конфигурация мРНК при терминации транскрипции может обуславливать скорость ее распада. Бактериальные ρ -независимые сигналы терминации транскрипции, которые содержат последовательности, способные образовывать шпильчатые структуры, также, по-видимому, выполняют защитную функцию при действии 3'-экзонуклеаз [2]. Шпильчатые структуры могут стабилизировать определенные области полицистронных мРНК. Ген *E. coli*, кодирующий ДНК-праймазу, расположен в середине оперона, который начинается с гена рибосомного белка *S21* и заканчивается геном σ -субъединицы РНК-полимеразы. Праймазный транскрипт распадается быстрее, чем два других участка, обладающих потенциальной возможностью образовывать шпильчатую структуру в 3'-терминальной области [26]. В мРНК эукариот структурные особенности 3'-концевой области также способствуют «защите» цепи мРНК от экзонуклеазных атак. Так, некоторые мРНК гистонов, не имеющие поли (A) на 3'-конце, терминируются последовательностью, формирующей шпильчатую структуру, вероятно, устойчивую к 3'-экзонуклеазе [27].

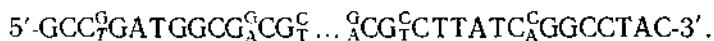
Одним из факторов, играющих важную роль в стабилизации мРНК, является ассоциация мРНК с рибосомами. Считается, что последние могут стерически защищать потенциальные участки расщепления от действия эндонуклеаз. Вопрос о роли рибосом в определении стабильности мРНК довольно спорный. Предполагают [2], что отсутствие рибосом будет снижать стабильность мРНК в том случае, если незащищенный участок содержит структуру или последовательность, чувствительную к эндонуклеазному расщеплению. В подтверждение участия «рибосомной защиты» в контроле экспрессии приводят пример генов *lac*-оперона *E. coli* [28], где дистальный цистрон мРНК (*lacA*) деградирует почти в два раза быстрее, чем проксимальный (*lacZ*).

Весьма интересный случай регуляции экспрессии за счет различной стабильности цистронов в полицистронном *rif*-опероне отмечается у *Rhodobacter capsulatus* [29]. Авторы обнаружили, что эффективность деградации отдельных сегментов РНК зависела от их локализации. В данном опероне отдельные сегменты РНК распадаются под действием определенных механизмов. Возможно, что участки мРНК, трансляция которых более эффективна, защищаются от деградации рибосомами. В то же время данное исследование показало, что этого недостаточно для защиты, поскольку деградация зависит от длины транслируемой матрицы (локализации искусственного терминирующего кодона). Ранее было обнаружено [30], что шпильчатая структура межцистронного района между *rifA*- и *rifL*-генами ответственна за относительную стабильность *LHI*-специфического сегмента мРНК. С помощью рекомбинантной плазмиды стоп-кодон гена *rifA* заменили на кодон для тирозина. В результате этого трансляция могла продолжаться через межцистронную область, содержащую шпильку. Еще один стоп-кодон был помещен в правильной рамке считывания 32 нуклеотидами выше 3'-конца шпильки и 50 нуклеотидами выше начала гена *rifL*. Оказалось, что продолжение трансляции через шпильку вызывает критическое сокращение периода полужизни мРНК. Терминация трансляции вблизи 5'-конца кодирующей области гена *rifL* приводила не только к быстрой деградации остатка мРНК соответствующего *rifL*, но и ускоряла распад мРНК обоих генов, находящихся ниже сайта абортированной трансляции. Авторы заключают, что продолжение трансляции вдоль определенной мРНК может влиять на скорость распада участков мРНК, удаленных от транслируемого района.

Участие REP-последовательности в регуляции экспрессии генов.

REP-последовательность — важная детерминанта стабильности мРНК *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. REP (repetitive extragenic palindromic — повторяющиеся экстрагенные палиндромные последовательности) являются высококонсервативными инвертированными повторами. Эти специфические последовательности, локализованные на 5'-конце молекулы мРНК, могут играть роль в определении их стабильности. Наличие REP-последовательности увеличивает период полужизни вышерасположенной РНК и служит защитой от 3'—5'-экзонуклеазных атак. REP-последовательности формируют стабильную длиннопетлевую структуру в мРНК. Они могут встречаться единично или по четыре стандартные копии, которые всегда инвертированы. На хромосоме *E. coli* REP-последовательности представлены 500—1000 копиями [31—33].

REP-последовательности принято еще называть PUs (palindromic units) — палиндромными единицами [32]. Они имеют общий вид



REP-последовательности обнаружены в оперонах прокариот, белковые продукты которых выполняют биосинтетические, деградиционные, регуляторные и другие функции. Транскрипты, синтезирующиеся в этих оперонах, хорошо охарактеризованы. Установлено, что палиндромы всегда находятся в транскрибируемых последовательностях, локализованы либо в интергенной области полицистронного оперона, либо в 3'-нетранслируемой области транскрипционной единицы, расположенной выше терминатора [33]. Тот факт, что REP-последовательности часто встречаются в интергенных областях, позволяет предположить, что в определенном хромосомном контексте они могут терминировать транскрипцию, образуя G—C-богатую длиннопетлевую структуру, характерную для р-независимых терминаторов. В этом случае действие REP-последовательностей аналогично аттенуатору [34]. Этим они регулируют соотношение уровней экспрессии генов внутри оперонов [31, 35]. Однако к настоящему времени полной определенности здесь нет. Эксперименты Штерна и др. [32] продемонстрировали, что REP-последовательности, как правило, не являются сигналами для терминации транскрипции. Эксперименты Гилсона и др. [36] показали также, что: а) в случае клонирования REP-последовательностей между каким-либо промотором и нижерасположенным геном значительного снижения экспрессии этого гена *in vivo* не отмечается; б) в системе транскрипции *in vitro* на REP-последовательностях не выявлено терминации транскрипции даже в присутствии известных факторов терминации, таких как *rho* и *NusA*; в) при делетации REP-последовательности из *hisJ*—*hisQ*-интергенной области хромосомного гистидинового транспортногo оперона *S. typhimurium* не происходило существенного увеличения экспрессии данного оперона, слитного с *lacZ*; REP-последовательность в *lamB-matM*-интергенной области не способна терминировать транскрипцию. Следовательно, терминация транскрипции не является нормальной функцией REP-последовательности. Вероятно, основная роль этой последовательности в контроле экспрессии генов связана с ее влиянием на стабильность мРНК. Как уже отмечалось, изменение в стабильности мРНК участвует в регуляции экспрессии генов бактерий [4]. REP-последовательность обычно ответственна за неодинаковую стабильность различных сегментов мРНК внутри оперона. Таким образом, различия в стабильности, обусловленные REP-последовательностью, могут обеспечивать разный уровень экспрессии отдельных генов, представленных цистронами в полицистронных мРНК [32]. Экспериментально доказано, что мРНК, стабилизированная REP-последовательностью, участвует в контроле экспрессии генов бактерий [4].

Исследовалась также взаимосвязь функций REP-последовательности и РНКазы III. РНКазы III расщепляет двойную цепь РНК [7],

длиннопетлевая структура REP-последовательности могла бы служить субстратом для этого фермента. Однако экспериментально установлено, что мРНК, содержащая REP-последовательность, не расщепляется РНКазой III *in vitro* [32]. В клеточных экстрактах РНКазы III штаммов мРНК в районе REP-последовательностей также не подвержена расщеплению. Хотя REP-последовательности в норме не являются участком для расщепления РНКазой III, возможно, что при определенной хромосомной локализации REP-последовательности в результате изменения структуры становятся чувствительными к расщеплению.

REP-последовательности защищают вышерасположенную мРНК от экзонуклеазного расщепления и могут стабилизировать эту мРНК. Специфическое накопление вышерасположенной мРНК происходит благодаря увеличению периода полужизни мРНК [4]. Примером может служить оперон *malEFG E. coli*, в котором *malE*-мРНК стабильнее, чем полная мРНК *malEFG*. Период полужизни *malE* равен 7—8 мин [37, 38], в то время как при делеции REP-последовательности из этого района он сокращался до 2 мин. Наоборот, при клонировании REP-последовательности в опероны, в которых она обычно не присутствует, период полужизни вышерасположенной мРНК увеличивался в 10 раз. REP-последовательности слабо или вообще не влияют на стабильность нижерасположенной мРНК. На 3'-конце гена или оперона REP-последовательности способны функционировать как детерминанты стабильности мРНК [37, 38].

REP-стабилизированная мРНК может быть трансляционно активной. Предполагая, что мРНК, стабилизированная REP-последовательностью, играет какую-то роль в контроле экспрессии гена, исследовали вероятность ее трансляционной активности. Для этого измеряли период полужизни REP-стабилизированной мРНК после ингибирования дальнейшей транскрипции рифампицином. мРНК *malE*, стабилизированная REP-последовательностью, оказалась трансляционно активной с периодом полужизни 7 мин. При делеции REP-последовательности из этого оперона, период полужизни сокращается до 2 мин. Эксперименты по удалению REP-последовательности из 3'-концов *gdhA*- и *glyA*-генов, которое привело к сокращению синтеза *GdhA*- и *GlyA*-белков [39, 40], служат еще одним доказательством того, что REP-стабилизированная мРНК участвует в контроле экспрессии генов. Интересным объектом для изучения участия REP-последовательности в регуляции экспрессии генов является *malEFG*-оперон, полицистронная мРНК которого содержит две REP-последовательности в *malE-malF*-интергенной области [41]. В этом опероне ген *malE* кодирует полный белок периплазмы, присутствующий в 20—40-кратном избытке по отношению к ассоциированным с мембраной *MalF*- и *MalG*-белкам [42], гены которых расположены ниже. Локализация REP-последовательности в *malE-malF*-интергенной области позволяет предположить, что последняя может обеспечивать увеличение стабильности *malE*-мРНК и, таким образом, разный уровень экспрессии генов внутри этого оперона [4, 37]. Следовательно, в этом опероне существует очевидная корреляция между соотношением стабильности *malE*- и *malF*-мРНК и относительным количеством соответствующих белковых продуктов. 1300 нуклеотидов мРНК *malE*, т. е. его транскрипт, стабилизированный REP-последовательностью, может потенциально кодировать *MalE*-белок. Если стабилизация этого транскрипта вносит свой вклад в регуляцию уровня экспрессии генов оперона *malEFG*, то стабилизированная мРНК является трансляционно активной и может направлять синтез *MalE*-белка. Чтобы определить, действительно ли REP-последовательности дифференцируют экспрессию, была сконструирована делеция из 96 п. о. внутри хромосомной *malE-malF*-интергенной области, удаляющая REP-последовательность из этого участка [37]. Как и предполагалось, эта делеция привела к меньшему накоплению мРНК. Кроме того, синтез *MalE*-белка значительно сократился. Это свидетельствует в пользу того, что различная стабильность мРНК благодаря наличию

REP-последовательностей определяет различный уровень экспрессии генов внутри данного полицистронного оперона. Поскольку делеция REP-последовательностей сокращает синтез *MalE*-белка (в 5—6 раз) до уровня, лимитирующего транспорт мальтозы и хемотаксис, то по крайней мере в этом опероне стабилизация мРНК REP-последовательностями имеет физиологически важное значение.

Предполагают, что REP-последовательности могут играть роль в организации прокариотической хромосомы, обеспечивая участки связывания для нуклеоидного белка [32].

Таким образом, REP-последовательности способны выступать в качестве детерминант стабильности матричной РНК и, как результат этого, экспрессии генов.

Детерминанты экспрессии на уровне трансляции. Трансляция — это энергетически зависимый процесс, состоящий из трех стадий: инициации, элонгации и терминации. В большинстве случаев наиболее важным этапом, контролирующим скорость трансляции, является инициация. Элонгация также оказывает влияние на скорость образования полипептидной цепи. На ее скорость, в свою очередь, может влиять частота встречаемости редких кодонов, оказывающая влияние на кинетику транслокации рибосом [43].

Инициация трансляции. Эффективность инициации трансляции биосинтеза белка играет огромную роль в регуляции экспрессии генов. Для *E. coli* она является мультикомпонентным процессом, требующим взаимодействия между всеми видами РНК (мРНК, 16S рРНК и фMet-тРНК^{Met}), факторами инициации трансляции (IF-1, IF-2 и IF-3) и рибосомными белками.

Информация, определяющая участок мРНК как сайт инициации трансляции, заключена в нескольких десятках нуклеотидов по обе стороны от стартового кодона. Контекст этой области инициации трансляции обуславливает функциональную роль. Сайты инициации трансляции обычно остаются функциональными даже для чужеродной мРНК, поэтому логично считать, что существует механизм, защищающий их от спаривания с удлиненными участками мРНК. Очевидно [44], что благодаря тесной взаимосвязи транскрипции и трансляции удаленные сайты матрицы не синтезируются во время первого раунда трансляции и, таким образом, не могут препятствовать инициации.

Рибосом-связывающий участок (RBS — ribosome binding site) определяется как область мРНК, защищенная от нуклеазной атаки в инициаторном комплексе. RBS включает в себя участок мРНК на 20 нуклеотидов ниже и на 13 нуклеотидов выше стартового кодона [45]. Контекст этого участка, а также его вторичная структура влияют на эффективность образования инициаторного комплекса и, следовательно, на уровень экспрессии. Таким образом, к детерминантам эффективности инициации трансляции для данной мРНК относятся: последовательность Шайна — Далгарно (Shine — Dalgarno — SD), расстояние от нее до инициаторного кодона, инициаторный и второй кодоны как первичной, так и вторичной структурой.

Роль последовательности Шайна — Далгарно и инициаторного кодона в инициации трансляции. Два ключевых элемента определяют сайт, с которого начинается трансляция: а) инициаторный кодон, обычно AUG, GUG, UUG или AUU; б) последовательность Шайна — Далгарно — короткая полипуриновая последовательность, обычно 3—6 нуклеотидов, располагающаяся на 5—12 нуклеотидов выше инициаторного кодона и комплементарная участку последовательности 3'-UUCCUCCA-5' на 3'-конце 16S рРНК. Относительно влияния стартового кодона на эффективность инициации трансляции можно отметить следующее. У большинства бактериальных генов иницирующим кодоном (встречающимся в 90 % случаев) является AUG, реже используется GUG (8 %) или UUG (1 %) и в единичном случае — AUU или AUA [45]. Эукариотическая и мутантная мРНК *E. coli* имеет в качестве стартового кодона ACG [46]. Среди бо-

лее 600 известных генов *E. coli* найдены восемь с UUG в качестве инициаторного: *cyo*, *lacA*, *fr lysis*, *ndh*, *deoA*, *carA*, *rpsT* и *pnp* [47]. Принято считать, что наиболее эффективным стартовым кодоном является AUG [45]. Однако при наличии оптимального сайта связывания рибосом инициация трансляции с кодонов, отличных от AUG, также может происходить эффективно. Гены *proC* *P. putida*, *E. coli* имеют SD-последовательности 5'-AGGAGG-3' и 5'-GGGAG-3' на расстоянии семи нуклеотидов от иницирующего кодона, вслед за которыми расположен триплет AAA: эти детерминанты оптимальны для инициации трансляции [45]. Необычные иницирующие кодоны могут быть элементами сложных систем регуляции трансляции: в гене *rpsT* кодон UUG входит в состав операторного участка ауторегуляции, в гене *infC* регуляция трансляции осуществляется, как предполагается, за счет специфических свойств иницирующего кодона AUU и продукта гена — фактора IF-3. Ген *infC* *Bacillus stearothermophilus* также использует AUU [47].

Наличие различных иницирующих кодонов (GUG и UUG) в гене *proC* указывает на то, что регуляция уровня его экспрессии осуществляется за счет селекции иницирующего кодона как одной из детерминант инициации трансляции.

Вторым критическим элементом, определяющим эффективность сайта инициации трансляции является последовательность Шайна—Далгарно, имеющая гомологию с 3'-концом 16S рРНК. Этот элемент «привлекает» 30S субчастицы рибосом к правильному стартовому сайту. Роль последовательности Шайна—Далгарно подтверждена экспериментами, в которых модификация анти-SD-последовательности 16S рРНК давала возможность рибосоме транслировать только мРНК, сохраняющие комплементарность своей 16S рРНК [48]. Взаимодействие между мРНК и рРНК является очень важным фактором в процессе инициации белкового синтеза. Наибольшее увеличение эффективности инициации трансляции гена *b* в *atp*-опероне *E. coli* наблюдалось в случае, когда SD-область была комплементарна по крайней мере четырем основаниям 3'-конца 16S рРНК [49]. Области, строго комплементарные 3'-концу 16S рРНК, являются пуриин-богатыми [50]. Замена даже одного основания в SD-районе 16S рРНК отрицательно действует на уровень синтеза большинства клеточных белков. Один из наиболее хорошо охарактеризованных функциональных районов рРНК *E. coli* представляет собой расположенный на 3'-конце 16S рРНК домен, простирающийся с позиции 1400 до 1542. Этот домен участвует в инициации трансляции, контролируя ее правильность [48]. Произведена мутация в области SD в позиции 1538 16S рРНК *E. coli* — замена цитидина на уридин. Показано, что рРНК с такой мутацией стабильно поддерживается в клетке только тогда, когда ее транскрипция репрессирована. При индукции мутантная рРНК транскрибируется и включается в функциональную рибосому. Через 4 ч после индукции мутантные рибосомы составляют 65 % общего числа рибосом в клетке. Присутствие таких рибосом катастрофически действует на клетку, изменяя относительный уровень синтеза многих белков, поскольку количество продуцируемых белков прямо зависит от эффективности инициации трансляции, которая определяется степенью комплементарности между мРНК и рРНК.

Часто ставится вопрос, является ли наличие SD-последовательности и стартового кодона достаточным для обеспечения инициации трансляции? Был проведен очень интересный эксперимент. Фрагментами, в которых встречались как истинные, так и «фальшстарты» инициации трансляции, замещали сайт инициации трансляции мРНК гена *lacZ*. Оказалось, что восстановление экспрессии β -галактозидазы обеспечивалось только фрагментами с истинными сайтами инициации трансляции, длина которых составляла 30—40 нуклеотидов вокруг инициаторного кодона. Следовательно, настоящий сайт инициации трансляции (СИТ) способен иницировать трансляцию не только собственной, но и чужеродной мРНК. В случае β -галактозидазы было показано также, что наиболее эффективная трансляция происходит только при

наличии в мРНК гена *lacZ* нативного сайта инициации трансляции [51].

Влияние СИТ на эффективность инициации трансляции связано с некоторыми факторами. Обычно наиболее эффективны СИТ, где область SD и стартовый кодон не вовлечены в спаривание. Статистический анализ показал, что определенные основания или короткие последовательности в специфическом положении могут облегчать узнавание SD-последовательности и стартового кодона 30S субчастицей рибосомы. Взаимодействие между основаниями 3'-конца 16S рРНК, комплементарных пурин-богатой области, расположенной выше инициаторного кодона AUG в мРНК, являются критическими для правильной инициации белкового синтеза.

Из всех оснований чаще всего выше и ниже стартового кодона встречается аденин, потенциально наименее способный к спариванию [52]. Проведенный теоретический анализ показал, что 71 пара нуклеотидов в районе истинных стартов трансляции гораздо менее структурирована, чем ложных. Несмотря на тенденцию СИТ к сохранению наибольшей свободной энергии, существует вероятность того, что удаленные от стартового кодона и SD-последовательности участки мРНК могут контактировать с аппаратом трансляции и повышать эффективность ее инициации. Это подтверждается статистическим анализом, выявившим также детерминанты эффективности инициации трансляции в виде дополнительных сайтов комплементарности 16S рРНК [53]. Структурно-функциональный анализ различных сайтов инициации трансляции осложнен способностью мРНК образовывать вторичную и третичную структуры. Внутримолекулярные взаимодействия могут определенно препятствовать инициации трансляции, что часто является главным фактором, контролирующим эффективность инициации. Таким образом, вторичная структура может контролировать доступность SD-последовательности, стартового кодона или других сигналов, узнаваемых 30S субчастицами рибосомы. Эксперименты по изучению трансляции *alp*-генов *E. coli* [49], кодирующих β , σ , α , γ и E субъединицы H^+ -АТФ-азы, показали, что участок от SD-последовательности до стартового кодона является G—C-богатым. По данным работы [54], высокий уровень экспрессии может быть достигнут в случае, когда расстояние от SD до инициаторного кодона соответствует 6—13 нуклеотидам, а оптимальное — 11. Длина SD-последовательности также влияет на эффективность инициации трансляции. Обычно длинные SD-последовательности «работают» намного лучше, чем короткие, в различных инициаторных комплексах, например, последовательность UAAGGAGG эффективнее, чем AAGGA [45]. Получены, однако, и противоположные данные, свидетельствующие о том, что очень длинные SD наименее эффективны [45]. Показано, что удлинение последовательности Шайна—Далгарно приводило к обратному эффекту — падению уровня экспрессии [55].

Присутствие двух SD в тандеме RBS может приводить к усилению экспрессии клонируемых генов [56]. В то же время есть и другие сведения [57, 58]: наличие двух функционально активных SD уменьшает трансляционную эффективность. На этом основании предполагают, что спирализация RBS ингибирует старт трансляции.

Полученные в последнее время данные свидетельствуют о том, что короткие последовательности в более широкой, чем —20...+13, области облегчают узнавание последовательности SD и стартового кодона 30S субчастицей рибосомы и, таким образом, увеличивают эффективность инициации трансляции. Например, область —58...—4 мРНК содержит последовательность UGAUCC, комплементарную нуклеотидам 1529—1534 16S рРНК, а область +4...+25 — последовательность UCAAACUCUCAAUUU, комплементарную 1—18 нуклеотидам 16S рРНК [59]. Анализ, проведенный Тханарай и Пандит [60], показал, что дополнительная область связывания рибосом «5'-UGAUCC» присутствует в мРНК высокоэкспрессирующихся генов. Гены со слабым уровнем экспрессии контролируются только наличием последователь-

ности Шайна—Далгарно. Участок на 16S рРНК (5'-GGAUCA-3') в положении 1529, который может спариваться с вышеуказанной последовательностью, узнается основанием в позиции 2390 на 23S рРНК. В свете консервативной природы и топографии этих сайтов предполагается, что сайт на 16S рРНК играет двоякую роль. Вначале он связывается с мРНК высокоэкспрессирующихся генов, образуя прочный инициаторный комплекс с 30S субчастицей, а при ассоциации 50S субчастицы — связывается с 23S рРНК, в результате чего сайт на мРНК высвобождается.

Второй кодон. Помимо вышеперечисленных факторов, на эффективность инициации трансляции в мРНК *E. coli* влияют также кодоны во втором положении. Анализ большого числа генов *E. coli* показал, что частота встречаемости кодонов во втором положении сильно отклоняется от общей частоты встречаемости кодонов *E. coli* и не является случайной [52]. Кодоны, следующие за инициаторным, могут оказывать либо отрицательное (ACA, GCG, UUC, CUG), либо положительное (AAA, GCU, UUU, CUU) действие на экспрессию гена [52]. По-видимому, влияние второго кодона зависит от окружающих его нуклеотидов, т. е. контекста. Луман и соавт. обнаружили, что вторые кодоны, понижающие уровень экспрессии, в основном G—C-богатые, в то время как кодоны, дающие высокий уровень экспрессии, в основном A—U-богатые [52]. Но в то же время бактериофаг T4 содержит много видов мРНК, у которых GCU-кодоны являются вторыми, и эти мРНК намного лучше транслируются [45]. В исследовании, проведенном Луманом и соавт. [52], установлено, что экспрессия гена *lacZ* зависит от того, какой кодон находится вслед за стартовым. Во второе положение вводились все 64 кодона, что приводило к разнице в уровне экспрессии гена в 15 раз. Не прослеживалось прямой зависимости между уровнем экспрессии (эффективности инициации трансляции) и количеством тРНК, соответствующих вторым кодонам. Кроме того, наблюдалось большое различие в уровне экспрессии для синонимических кодонов, использующих одинаковую тРНК. По мнению авторов, эффект изменений в уровне экспрессии является следствием влияния нуклеотидов второго кодона на вторичную структуру RBS [52]. Аналогичные данные были получены и при изучении эффекта нуклеотидов, следующих за стартовым, на экспрессию в *E. coli* гена соматотропина быка [61].

Очевидно, что влияние второго кодона может быть, по крайней мере, двояким. С одной стороны, оно может проявляться в изменении стабильности инициаторного комплекса, с другой — действие второго кодона может быть обусловлено его вкладом в формирование определенной пространственной организации RBS. Можно предположить, что в отдельных случаях эффекты вторых кодонов имеют иную природу, связанную, к примеру, с общей стабильностью мРНК.

Редкие кодоны. В высокоэкспрессирующихся генах *E. coli* используются исключительно те кодоны, которые транслируются обильными тРНК, и фактически не содержатся кодоны, узнаваемые очень редкими тРНК [62]. Существуют экспериментальные доказательства того, что присутствие оптимальных кодонов (т. е. транслируемых редкими тРНК) может снижать скорость трансляции [63—65]. Эффективность трансляции высокоэкспрессирующихся генов находится в прямой зависимости от количества редких кодонов. Таких кодонов 10, частота встречаемости их RSCU (relative synonymous codon usage) $< 0,05$ [66]. Эти кодоны транслируются минорными видами тРНК. Единственным исключением является кодон CGA, узнаваемый обильной Arg тРНК, которая также транслирует CGU- и CGC-кодоны [66].

Минорные кодоны приводят к паузе при трансляции на мРНК. Близкорасположенный к стартовому редкий кодон вызывает остановку рибосомы. Чем ближе расположен сайт остановки рибосомы к инициаторному участку, тем эффективней ингибиторное действие остановившейся рибосомы на инициацию трансляции [67, 68]. Не только AGA/AGG-кодоны, но и большинство других редких кодонов предпо-

чительно локализованы в районе первых 25 кодонов мРНК *E. coli*, следующих за инициаторным. Остановившаяся рибосома связывается с мРНК возле сайта инициации трансляции, предотвращая поступление других рибосом. Рибосома, сделавшая паузу, также блокирует образование полисом, в результате чего мРНК становится более уязвимой для нуклеазного расщепления.

Одним из факторов, определяющих эффективность трансляции мРНК, может быть наличие в ней редких кодонов не только в сайте инициации, но и на протяжении всей матрицы. По-видимому, негативный эффект присутствия редких кодонов вне сайта инициации трансляции характерен лишь для определенных мРНК. Известно, например, что в гене *lacZ E. coli* встречается по 9 GGG- и CCC-кодонов. Показано также, что введение многочисленных редких кодонов, которые в норме отсутствуют в высокоэкспрессирующемся гене *sspB Bacillus subtilis*, не привело к снижению уровня экспрессии [69]. Вместе с тем имеются экспериментальные доказательства негативного влияния редких кодонов на уровень экспрессии генов *E. coli*.

Введение редкого кодона AGG в высокоэкспрессирующийся ген снижало скорость трансляции [63], а введение редкого кодона GGG в контекст сайта инициации трансляции оказывало отрицательное действие на уровень экспрессии гена *rplJ E. coli* [65]. Замена трех редких кодонов AGG на три GCT существенно увеличивала уровень экспрессии генов [64]. Негативное влияние редких кодонов на эффективность инициации трансляции прослеживалось и в том случае, когда нативная последовательность сайта инициации трансляции мРНК *lacZ* заменялась на полилинкерную, содержащую кодоны AAU, 2 UGC, AGG, UCC и CCC [70].

Таким образом, редкие кодоны влияют на эффективность трансляции в результате паузы в синтезе полипептидной цепи, которая необходима для отбора соответствующей минорной тРНК, либо изменяя вторичную структуру мРНК в 5'-концевой области [65, 71].

Вторичная структура сайта инициации трансляции. Многочисленными исследованиями показано влияние вторичной структуры RBS на эффективность инициации трансляции у прокариот и, следовательно, на экспрессию генов [72—77]. С этим обстоятельством связан тот факт, что во всей области от -20 до $+13$ существует тенденция к наличию большого числа аденинов [75].

Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют о том, что прочная вторичная структура мРНК в сайте инициации отрицательно сказывается на эффективности трансляции. Например, показано, что введение двух замен, приводящих к более прочному спариванию нуклеотидов области $-3...+6$ и $-6...+9$ в стебле шпильки, содержащей стартовый кодон мРНК гена белка оболочки фага MS2, как и предполагалось, снизило эффективность трансляции в результате стабилизации вторичной структуры [78]. Интересно, что в данном случае спаривание стартового кодона и последовательности SD не изменялось. Более стабильной становилась вторичная структура в области $-20...+13$. Подсчет свободной энергии ΔG подтвердил предположенную ранее идею о том, что эффективность инициации трансляции определяется наличием неструктурированных RBS [76].

Негативное действие прочной вторичной структуры мРНК на эффективность трансляции было прослежено и на примере гена термостабильной протеазы *B. subtilis* [79]. Предполагая, что контекст в СИТ определяет вторичную структуру и, следовательно, доступность мРНК для образования инициаторного комплекса, последовательно изменяли вторичную структуру мРНК посредством модификаций в вероятных шпильчатых участках. Обнаружилось, что присутствие прочной шпильки (-20 ккал/моль), начиная с 12-го кодона, не влияло на уровень экспрессии.

Контекст мРНК выше стартового кодона также обуславливает эффективность трансляции. В гене *bst* эффективность экспрессии резко

возросла при наличии у него А—Т-богатого RBS. На примере вируса желтой лихорадки (YFV) обнаружено, что эффективность трансляции мРНК зависит от образования определенной вторичной структуры [80]. Эффективность трансляции *in vitro* отличалась в 1—15 раз, коррелируя с возможностью 5'-нетранслируемой последовательности образовывать стабильную вторичную структуру. Интересно, что присоединение 5'-нетранслируемого участка мРНК YFV к гетерологичной мРНК (вируса Germiston) повысило в два раза эффективность трансляции по сравнению с гомологичным транскриптом вируса Germiston. Таким образом, 5'-нетранслируемый участок мРНК YFV может выполнять функцию энхансера. Данные, полученные с помощью серии плазмид, сконструированных для слияния с 5'-районом генома YFV разных участков кодирующей последовательности, показали, что взаимодействие между нетранслируемой и транслируемой последовательностями может изменять эффективность трансляции мРНК. Эксперименты подтвердили, что упрочение вторичной структуры при внесении в мРНК искусственных последовательностей вызывало в некоторых случаях снижение эффективности их трансляции. Почти полное ингибирование трансляции происходило, когда значение ΔG достигало —50 ккал/моль, соответствуя структуре, которая не может быть расплетена передвигающейся 30S субчастицей рибосомы. Эти результаты очень интересны с точки зрения прикладного применения, так как они указывают на необходимость учета возможного влияния структурных изменений мРНК на эффективность экспрессии гена. Еще одна важная роль вторичной структуры мРНК в контроле уровня экспрессии связана с РНК-белковым взаимодействием. Получены конкретные экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что определенная вторичная структура, а не первичная структура мРНК необходима, например, для взаимодействия *env* мРНК вируса HIV с Rev-белком, контролирующим экспорт HIV мРНК из ядра в цитоплазму [81].

Существует целый ряд теоретических моделей вторичной структуры инициаторных областей прокариотических мРНК, объясняющих влияние макроструктуры матрицы на специфичность узнавания инициаторного кодона [82]. Во всех подобных моделях для эффективного узнавания рибосомами инициаторной области мРНК постулируется необходимость, по крайней мере, одной из детерминант матрицы, находящейся в одноцепочечном участке. Результаты, полученные в работе [83], позволяють предположить влияние на эффективность инициации трансляции не только элементов вторичной структуры в области инициаторного кодона и SD-последовательности, но и в участках мРНК, удаленных от зоны инициации трансляции. Наиболее доступными для узнавания рибосомами являются те области матрицы, у которых детерминанты инициации трансляции могут быть экспонированы в составе протяженного одноцепочечного участка. При этом однонитчатый участок в области инициации трансляции, по-видимому, существует некоторое время по ходу синтеза мРНК, обеспечивая высокую эффективность узнавания инициаторной зоны рибосомами, либо образовывается под воздействием рибосом при терминации трансляции предыдущего цистрона или, наконец, формируется при взаимодействии по Шайну—Далгарно.

Для узнавания матрицы, в принципе, достаточно одного инициаторного кодона, экспонированного в составе участка РНК со слабой вторичной структурой. Структуры такого вида, вероятно, и обеспечивают конкретную доступность инициаторного участка для узнавания рибосомами. Более сложная вторичная структура в природных мРНК маскирует инициаторный кодон, создавая возможность тонкой регуляции синтеза белка на уровне инициации трансляции. Пример этому — сопряженность инициации трансляции в мРНК L11—L1- и L10—L17/L12-оперонов [84].

Эффективность инициации трансляции зависит от энергетических затрат на разрушение инициаторного комплекса.

При создании искусственных гибридных оперонов с частично перекрывающимися генами с помощью машинного анализа показано, что по мере синтеза соответствующих мРНК может формироваться первоначально короткая шпилька ($\Delta G = -1,5$ ккал/моль), характерная для транскрипта гена *lacZ*, а последующий рост цепи приводит к образованию стабильных ($\Delta G = -7$ или $\Delta G = -9$ ккал/моль) шпилечных структур, содержащих последовательность SD и кодон AUG в спаренном участке [85]. Такая пространственная организация, по-видимому, и приводит к неэффективной трансляции этих мРНК. Последующее образование еще одной шпильки с $\Delta G = -13$ ккал/моль в кодирующей части мРНК может дополнительно стабилизировать вторичную структуру 5'-концевого участка. Таким образом, на уровень инициации трансляции, очевидно, в значительной мере задаваемый размером и структурой однонитчатого участка, образуемого в инициаторной зоне под воздействием рибосом [82], может влиять доступность SD-последовательности для взаимодействия с 3'-концом 16S рРНК, обусловленная значением ΔG инициаторной шпильки (и, возможно, третичной структурой), и скорость освобождения зоны мРНК транслирующей рибосомой, определяемая ΔG вторичной структуры прилежащего участка мРНК [83].

І. В. Крупська, Є. Б. Патон

ДЕЯКІ МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ПОСТТРАНСКРИПЦІЙНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ПРОКАРІОТ

Резюме

Огляд містить розділи, присвячені молекулярним механізмам посттранскрипційного контролю експресії генів. Розглянуто процеси деградації мРНК, участь REP-последовательности в регуляції експресії генів, а також детермінанти експресії на рівні ініціації трансляції: послідовність Шайна—Далгарно, відстань від неї до ініціаторного кодона, ініціаторний та другий кодони, рідкісні кодони.

I. V. Kroupskaya, E. B. Paton

SOME MOLECULAR MECHANISMS OF THE POSTTRANSCRIPTIONAL REGULATION OF PROCARYOTIC GENE EXPRESSION

Summary

This review consist of parts dedicated to the molecular mechanisms of posttranscriptional control of gene expression. It is shown the mRNA degradation process, participation of REP-sequence in the regulation of gene expression, and also the determinants of expression on the level of transcriptional initiation: the Shaine—Dalgarno sequence, the distance from it to initiate-codone, initiated and second codones, and rare codones.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Belasco J. G., Chen C.-Y. A. Mechanism of *puf* mRNA degradation: the role of an intercistronic stem-loop structure // *Gene*.—1988.—72, N 1—3.—P. 109—117.
2. Belasco J. G., Higgins C. F. Mechanism of mRNA decay in bacteria: perspective // *Ibid.*—P. 15—23.
3. Klug G., Amams C. W., Belasco J. G. et al. Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effect of deletion of the intercistronic hairpin-loop region of the *R. capsulatis* *puf* operon // *EMBO J.*—1987.—6, N 11.—P. 3515—3520.
4. Newbury S. F., Smith N. H., Robinson E. C. et al. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences // *Cell*.—1987.—48, N 2.—P. 297—310.
5. Doutscher M. P. *E. coli* RNase: making sense alphabat soup // *Ibid.*—1985.—40, N 4.—P. 731—732.
6. Regnier P., Hajsnsdorf N. Decay of mRNA encoding ribosomal protein S15 *Escherichia coli* is initiated by an RNase E-depended endonucleolytic cleavage that removes the 3'-stabilising stem and loop structure // *J. Mol. Biol.*—1991.—217, N 2.—P. 283—292.

7. Robertson H. D. *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites // *Cell*.—1987.—48, N 1.—P. 5—6.
8. Saulio H., Richardson C. C. Processing of mRNA by ribonuclease III regulates expression of gene 1.2 of bacteriophage T7 // *Ibid.*—1981.—27, N 3.—P. 533—542.
9. Altuvia S., Locker-Gitaldi H., Koby S. et al. RNase III stimulates the translation of the CIII gene of bacteriophage lambda // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1987.—84, N 15.—P. 6511—6515.
10. Krinke L., Wulff D. L. Oop RNA produced from multicopy plasmids, inhibits lambda CII gene expression through an RNase III depended mechanism // *Genes Develop.*—1987.—1, N 3.—P. 1005—1013.
11. Simons R. W., Kleckner N. Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes // *Annu. Rev. Genet.*—1988.—22, N 2.—P. 567—600.
12. Portier C., Dondon L., Grunberg-Monago M., Gernier P. The first step in the functional inactivation of the *E. coli* polynucleotide phosphorylase messenger is a ribonuclease III processing at the 5' end // *EMBO J.*—1987.—6, N 5.—P. 2165—2170.
13. Bardweel J. C. A., Begnier P., Chen S. et al. Autoregulation of RNase operon by mRNA processing // *Ibid.*—1989.—8, N 7.—P. 3401—3407.
14. Regnier P., Grunberg-Monago M. Cleavage by RNase III in the transcripts of the *metY-nusA-infB* operon of *E. coli* release the tRNA and initiates the decay of the downstream mRNA // *J. Mol. Biol.*—1989.—210, N 1.—P. 293—302.
15. Schneissner V., McKenny K., Rosenberg M., Court D. Removal of a terminator structure by RNA processing regulates into gene expression // *J. Mol. Biol.*—1984.—176, N 1.—P. 39—53.
16. Downing W. L., Sullivan S. L., Gottesman M. E., Dennis P. P. Sequence and transcriptional pattern of the essential *E. coli* *secE-nusG* operon // *J. Bacteriol.*—1988.—172, N 3.—P. 1621—1627.
17. Mudd E. A., Prentki P., Belin D., Krisch H. M. Processing of unstable bacteriophage T4 gene 32 mRNAs into a stable species requires *E. coli* ribonuclease E // *EMBO J.*—1988.—7, N 11.—P. 3601—3607.
18. Carpousis A. J., Mudd E. A., Krisch H. M. Transcription and messenger RNA processing upstream of bacteriophage T4 gene 32 // *Mol. and Gen. Genet.*—1989.—219, N 1.—P. 39—48.
19. Mudd E. A., Carpousis A. J., Krisch H. M. *E. coli* RNase E has a role in the decay of bacteriophage T4 RNA // *Genes Develop.*—1989.—4, N 1.—P. 873—881.
20. Tomcsanyi T., Apirion D. Processing enzyme ribonuclease E specifically cleaves RNA I an inhibitor of primer formation in plasmid DNA synthesis // *J. Mol. Biol.*—1985.—185, N 3.—P. 713—720.
21. Melefors O., von Gabain A. Site specific endonucleolytic cleavage and the regulation of stability of *E. coli* *ompA* mRNA // *Cell*.—1988.—52, N 3.—P. 893—901.
22. Lunberg V., von Gabain A., Melefors O. Cleavages in the 5' region of the *ompA* and *bla* mRNA control stability: studies with an *E. coli* mutant altering mRNA stability and novel endoribonuclease // *EMBO J.*—1991.—9, N 9.—P. 2731—2741.
23. Brownerman G. Determination of messenger RNA stability // *Cell*.—1987.—48, N 1.—P. 6—7.
24. Kingscherf T. G., Apirion D. Polynucleotide phosphorylase can participate in decay of mRNA in *Escherichia coli* in the absence of ribonuclease II // *Mol. and Gen. Genet.*—1975.—139, N 2.—P. 357—362.
25. Donovan W. P., Kushner S. R. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12 // *Proc. Nat. Acad. Sci USA*.—1986.—83, N 1.—P. 120—124.
26. Burton Z. F., Gross C. A., Watanabe K. K., Burgess R. R. The open that encodes the sigma subunit of RNA polymerase also encodes ribosomal protein S12 DNA primase in *E. coli* K-12 // *Cell*.—1983.—32, N 3.—P. 335—349.
27. Georgiev N. K., Birnstiel H. J. The conserved CAAGAAAGA spacer sequence is an essential element for the formation of 3' termini of the sea urchin H3 histone mRNA by RNA processing // *EMBO J.*—1985.—4, N 2.—P. 481—489.
28. Kennel D., Riezman H. Transcription and translation initiation frequencies of the *Escherichia coli* *lac* operon // *J. Mol. Biol.*—1977.—114, N 1.—P. 1—21.
29. Klug G., Cohen S. H. Effects of translation on degradation of mRNA segments transcribed from the polycistronic *puf* operon *Rhodobacter capsulatus* // *J. Bacteriol.*—1991.—173, N 4.—P. 1478—1484.
30. Belasco J. G., Beatty J. T., Adams C. W. et al. Differential expression of photosynthetic genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic transcript // *Cell*.—1985.—40, N 1.—P. 171—181.
31. Higgins C. F., Ames G. F.-L., Barnes W. M. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons // *Nature*.—1982.—298, N 2.—P. 760—762.
32. Stern M. J., Ames G. F.-L., Smith N. H. et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome // *Cell*.—1984.—37, N 3.—P. 1015—1026.
33. Higgins C. F., McLoren R. S., Newbury S. F. Repetitive extragenic palindromic sequences mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion — a review // *Gene*.—1988.—72, N 1.—P. 3—14.
34. Hundson G. S., Davidson B. E. Nucleotide sequence and transcription of the phenylalanine and tyrosine operons of *E. coli* K-12 // *J. Mol. Biol.*—1984.—180, N 4.—P. 1023—1051.

35. Valentin-Hausen P., Hammer-Jespersen K., Boetius F. et al. Structure and function of the intercistronic regulatory *deoC-deoA* element of *Escherichia coli* K-12 // *Ibid.*— P. 179—183.
36. Gilson E., Rousset J. P., Clement J.-M., Hotming M. A subfamily of *E. coli* palindromic units implicated in transcription—termination // *Annu. Inst. Pasteur.*—1986.— 137B.— P. 259—270.
37. Nawbury S. F., Smith N. H., Higgins C. F. Differential mRNA stability controls relative gene expression within polycistronic operon // *Cell.*—1987.— 51, N 6.— P. 1131—1143.
38. Merino E., Becerrie B., Valle F., Bolivar F. Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA // *Gene.*—1987.— 58, N 1—3.— P. 305—309.
39. Becerrie B., Valle F., Mermo E. et al. Repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in the *Escherichia coli* *gdhA* gene // *Ibid.*—1985.— 37, N 1—3.— P. 53—62.
40. Plamann M. D., Stauffer G. V. Characterization of a *cis-acting* regulatory mutation that maps at the distal end of the *Escherichia coli* *glyA* gene // *J. Bacteriol.*—1985.— 161.— P. 650—654.
41. Froshauer S., Beckwith J. The nucleotide sequence of the gene for *malF* protein. An inner membrane component of the maltose transport systems of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.*—1984.— 259, N 19.— P. 10896—10903.
42. Manson M. D., Boos W., Bassford P. J., Rasmussen B. A. Dependence of maltose transport and chemotaxis on the amount of maltose binding protein // *Ibid.*—1985.— 260, N 17.— P. 9727—9733.
43. Sorensen M. A., Kurland C. G., Pedersen S. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.*—1989.— 207, N 2.— P. 365—377.
44. Jacques N., Dreifus M. Translation initiation in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.*—1990.— 4, N 7.— P. 1063—1067.
45. Gold L. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli* // *Annu. Rev. Biochem.*—1988.— 57, N 1.— P. 199—233.
46. Peabody D. S. Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells // *J. Biol. Chem.*—1989.— 264, N 11.— P. 5031—5035.
47. Бони И. В., Боронин А. М. Редкие иницирующие кодоны — регуляторы экспрессии гена *trpC* // *Биоорг. химия.*—1990.— 16, № 18.— С. 1134—1137.
48. Jacob W. F., Santer M., Dahlberg A. E. A single base change in the Shine—Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.— 84, N 14.— P. 4757—4761.
49. McCarthy J. E. G., Bokelmann C. Determinants of translational initiation efficiency in the *atp* operon of *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.*—1988.— 2, N 4.— P. 455—465.
50. Min K. T., Kim M. H., Lee D.-S. Search for the optimal sequence of the ribosomal binding site by random oligonucleotide-directed mutagenesis // *Nucl. Acids Res.*—1988.— 16, N 11.— P. 5075—5088.
51. Looman A. C., de Gruyter M., Vogelar A., Knippenberg P. H. Effects of heterologous ribosomal binding sites on the transcription and translation of the *lacZ* gene of *Escherichia coli* // *Gene.*—1985.— 37, N 1.— P. 145—154.
52. Looman A. C., Bodlaender J., Comstok L. J. et al. Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified *lacZ* gene in *Escherichia coli* // *EMBO J.*—1987.— 6, N 8.— P. 2489—2492.
53. Petersen G. B., Stokwell P. A., Hill D. F. Messenger RNA recognition in *Escherichia coli*: a possible second site of interaction with 16S ribosomal RNA // *Ibid.*—1988.— 7, N 11.— P. 3957—3962.
54. Dalboge H., Carlsen S., Jensen E. B. et al. Expression of recombinant growth hormone in *Escherichia coli*: effect of the region between the Shine—Dalgarno sequence and ATG initiation codon // *DNA.*—1988.— 7, N 6.— P. 399—405.
55. De Boer C. D., Shepard S. K. Strategius for optimizing foreign gene expression in *Escherichia coli* // *Genes, structure and expression. Horizons in biochemistry and biophysics* / Ed. A. M. Kroon.— New York, 1983.— Vol. 7.— P. 205—248.
56. Grundstrom T., von Gabain A., Nilsson G. et al. Expression of an interferon-alfa gene variant in *E. coli* using tandemly repeated synthetic ribosomal binding sites // *DNA.*—1987.— 6, N 1.— P. 41—46.
57. McCarthy J. E. G., Schauder B., Ziemke P. Posttranscriptional control in *Escherichia coli*; translational and degradation of the *atp* operon mRNA // *Gene.*—1988.— 72, N 1—3.— P. 131—139.
58. Berkhout B., Kastelein R. A., van Duin J. Translational interference at overlapping reading frames in prokaryotic messenger RNA // *Ibid.*—1985.— 37, N 1—3.— P. 171—179.
59. McCarthy J. E. G., Gualerzy C. Translational control of prokaryotic gene expression // *Trends Genet.*—1990.— 6, N 3.— P. 78—85.
60. Thanaraj T. A., Pandit M. W. An additional ribosome binding site on mRNA of highly expressed genes and a bifunctional site on the colicin fragment of the 16S RNA from *Escherichia coli*: important determinants of the efficiency of translation initiation // *Nucl. Acids Res.*—1989.— 17, N 8.— P. 2973—2985.
61. Tomich C.-S. C., Olson E. R., Olsen M. K. et al. Effect of nucleotide sequence directly downstream from the AUG on the expression of the bovine somatotropin in *E. coli* // *Ibid.*— P. 3179—3187.

62. *Ikemura T.* Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its proteins genes // *J. Mol. Biol.*—1981.—146, N 1.—P. 1—21.
63. *Robinson M., Linney R., Little S. et al.* Codon usage can effect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli* // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12, N 17.—P. 6663—6671.
64. *Bonekamp F., Andersen H. D., Christensen T., Jensen K. F.* Codon-defined ribosomal pausing in *Escherichia coli* detected by using the *pyrE* attenuator toprobe the coupling between transcription and translation // *Ibid.*—1985.—13, N 11.—P. 4113—4123.
65. *Крупская И. В., Патон Е. Б.* Влияние редких кодонов в 5'-концевой области на эффективность экспрессии генов *rplJ'-lacZ* и *rplL'-lacZ* // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 4.—С. 112—115.
66. *Sharp P. M., Li W.-H.* Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for «rare» codons // *Nucl. Acids Res.*—1986.—16, N 19.—P. 7737—7749.
67. *Chen G., Inouye M.* Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression: preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes // *Ibid.*—1990.—18.—P. 1465—1473.
68. *Inouye M., Chen G.* Regulation of gene expression by minor codons in *Escherichia coli*; minor codon modulator hypothesis // *Post-transcriptional control of gene expression* // Eds J. E. G. McCarthy, M. F. Tuite.—Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.—Vol. H49.—P. 217—225.
69. *Loshon C. A., Tover-Rojo F., Goldrich S. E., Setlow P.* The expression of a highly expressed *Bacillus subtilis* gene is not reduced by introduction of multiple codons normally not present in such genes // *FEMS Microbiol. Lett.*—1989.—65, N 1.—P. 59—64.
70. *Looman A. C., de Gruyter M., Vogelaar A., Knippenberg P. H.* Effects of heterologous ribosomal binding sites on the transcription and translation of the *lacZ* gene of *Escherichia coli* // *Gene.*—1985.—37, N 1—3.—P. 145—154.
71. *Lusting F., Boren T., Guindy Y. S. et al.* Codon discrimination and anticodon structural context // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86, N 18.—P. 6873—6877.
72. *Buell G., Schultz M.-F., Chollet A. et al.* Optimizing the expression in *E. coli* of a synthetic gene encoding somatomedin-C (IGF-1) // *Nucl. Acids Res.*—1985.—12, N 2.—P. 1923—1938.
73. *Looman A. C., van Knippenberg P. H.* Effects of GUG and AUG initiation codons on the expression of *lacZ* in *Escherichia coli* // *FEBS Lett.*—1986.—197, N 1.—P. 315—320.
74. *Shinedling S., Gayle M., Pribnow D., Gold L.* Mutations effecting translation of the bacteriophage T4 *r11B* gene cloned in *Escherichia coli* // *Mol. and Gen. Genet.*—1987.—207.—P. 224—232.
75. *Spanjaard R. A., van Dijk M. C. M., Turion J., van Duin J.* Expression of the rat interferon- α 1 gene in *Escherichia coli* controlled by the secondary structure of the translation initiation region // *Gene.*—1989.—80, N 1—3.—P. 345—351.
76. *De Smit M. H., van Duin J.* Control of prokaryotic translational initiation by mRNA secondary structure // *Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.*—1990.—38, N 1.—P. 1—35.
77. *Gren E. J.* Recognition of messenger RNA during translational initiation in *Escherichia coli* // *Biochimie.*—1984.—6, N 1.—P. 1—29.
78. *Skripkin E. A., Adhin M. R., de Smit M. H., van Duin J.* Secondary structure of the central region of bacteriophage MS2 RNA // *J. Mol. Biol.*—1990.—211, N 2.—P. 447—463.
79. *Kubo M., Imanaka T.* mRNA secondary structure in an open reading frame reduces translation efficiency in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.*—1989.—171, N 7.—P. 4080—4082.
80. *Ruiz-Linares A., Bouloy M., Girard M., Cahour A.* Modulations of the *in vitro* translational efficiencies of Yellow Fever virus mRNAs: interactions between coding and noncoding regions // *Nucl. Acids Res.*—1989.—17, N 7.—P. 2463—2477.
81. *Olsen H. S., Nelbock P., Cochrane A. W., Rosen C. A.* Secondary structure is the major determinant for interaction of HIF rev protein with RNA // *Science.*—1990.—247, N 3.—P. 845—848.
82. *Худяков Ю. Е.* Последовательность Шайна — Далгарно и эффективность инициации трансляции // *Молекуляр. биология.*—1985.—19, № 3.—С. 702—716.
83. *Худяков Ю. Е., Калинина Т. И., Неплюева В. С., Смирнов В. Д.* Корреляция между эффективностью инициации трансляции и вторичной структурой мРНК у гибридного гена *cro-lacZ* // *Там же.*—1987.—21, № 8.—С. 1504—1512.
84. *Nomura N.* Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal component in *Escherichia coli*: translational regulation and feedback loops // *Regulation of gene expression: Symp. of the Soc. for general microbiology* / Eds I. Booth, C. Higgins.—Cambridge: Univ. press, 1986.—P. 199—220.
85. *Обвинников Ю. А., Свердлов Е. Д., Царев С. А., Монастырская Г. С.* Свойства альфа-интерферона человека F и гибридного интерферона F/D, полученных из рекомбинантных бактерий // *Докл. АН СССР.*—1983.—268.—С. 996—1000.