



УДК 577.217

© 1990 г.

*В. В. Кравченко, В. В. Шагин, И. П. Гилева,
В. А. Диховшай, С. К. Горженевский, В. Н. Добрынин*,
[С. А. Филиппов*], С. А. Чуенило*, В. Г. Коробко**

**МОДЕЛЬНЫЙ ПОЛИЦИСТРОННЫЙ ОПЕРОН ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
СОПРЯЖЕННОЙ ТРАНСЛЯЦИИ В КЛЕТКАХ *E. COLI*.
РОЛЬ ПОТОКА РИБОСОМ**

ИПО «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.;

**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва*

На основе плазмид серии pLZ381N, содержащих полицистроны IX-VIII-*lacZ* четырех типов, сконструированы две новые серии плазмид — p50FN и p0FN. Эти плазмиды включают в себя полицистроны четырех типов, аналогичные тем, что содержатся в плазмидах серии pLZ381N, но отличающиеся по составу. В вариантах p50FN полицистроны состоят из генов IX-VIII-IFN-*lacZ*, а в вариантах p0FN — из генов IX-VIII-IFN'-*lacZ*. Полицистроны одного типа, синтезирующиеся с плазмид pLZ381N, p50FN и p0FN, в районе инициации трансляции гена *lacZ* (SD_{*lacZ*} — AUG) имеют тождественные первичные и вторичные структуры. При этом уровень трансляции цистрона C_i (либо IFN', либо VIII, либо IFN), предшествующего гену *lacZ*, в вариантах мРНК p0FN, pLZ381N и p50FN различается и составляет в условных единицах: 0 для IFN', 1 для VIII и 15 для IFN. Показано, что в отсутствие трансляции цистрона C_i (IFN') в вариантах p0FN экспрессия гена *lacZ* существенно снижена. С другой стороны, трансляция цистрона C_i в вариантах pLZ381N и p50FN приводит к значительной активации синтеза β -галактозидазы, и в некоторых случаях уровень экспрессии *lacZ* значительно превышает уровень экспрессии C_i . Обнаружено, что в полицистроновых мРНК вариантов pLZ381N и p50FN, дополнительно к эффекту взаимного расположения терминирующего и иницирующего сигналов цистронов C_i и *lacZ*, степень активации гена *lacZ* зависит от эффективности трансляции цистрона C_i . Полученные данные позволяют заключить, что в полицистроновых мРНК уровень экспрессии дистального цистрона может регулироваться потоком рибосом, образующимся при трансляции предшествующего цистрона.

Полицистроновые мРНК, кодирующие несколько белков, широко распространены у бактерий. Уровни синтеза разных белков при трансляции полицистроной мРНК оказываются неодинаковыми и в некоторых случаях отличаются в 10—100 раз [1]. Это позволяет предполагать, что есть трансляционные механизмы, определяющие количественные соотношения продуктов синтеза отдельных генов полицистроной матрицы. На реальное существование таких механизмов указывает эффект полярных мутаций [2—4] и связанные с этим явления сопряженной трансляции цистронов [5—7] и реинициации трансляции [8—11]. Были высказаны предположения, что причина полярности трансляции цистронов вызвана уменьшением стабильности или ранней терминацией транскрипции мРНК, которая неактивна в трансляции [12, 13]. Известны также примеры, когда изменения уровней синтеза продуктов некоторых генов в полицистромах не связаны с количеством мРНК, а зависят от взаимного расположения терминирующего и иницирующего сигналов двух соседних генов [6, 7, 14, 15]. В случае перекрывающихся генов показано влияние трансляции предшествующего цистрона на эффективность инициации трансляции следующего цистрона [16, 17].

Возникает вопрос: как влияет эффективность трансляции предшествующего цистрона на экспрессию следующего цистрона в зависимости от взаимного расположения терминирующего и иницирующего сигналов этих генов в полицистрононе? В настоящей работе мы сконструировали и ис-

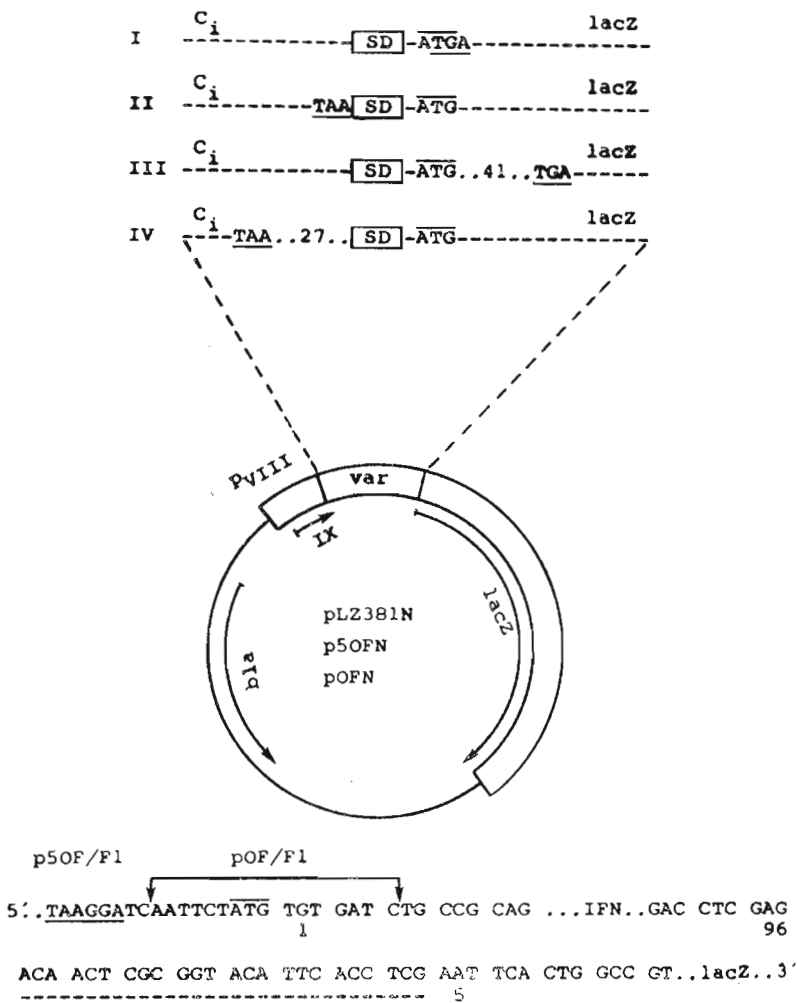


Рис. 1. Общая схема структуры плазмид pLZ381N, p50FN, содержащих модельные полицистроны четырех типов (I—IV). В качестве векторов использовали ДНК серии pLZ381N. P_{VIII}, IX — промотор и ген бактериофага M13, входящие в состав фрагмента *TagI*-381. var — вариабельный участок, содержащий в зависимости от серии плазмид: pLZ381N — укороченную последовательность гена VIII ДНК фага M13; p50FN — *XhoI/EcoRI*-фрагмент плазмиды pIF6/8, встроенный по сайту *EcoRI* в плазмиды pLZ381N в присутствии синтетического адаптера (см. «Экспер. часть»); p0FN — тот же фрагмент, что и в p50FN, но содержащий делецию в начале гена интерферона. C_i — общее обозначение цистрона, предшествующего гену *lacZ*. Цистрон C_i в плазмиде pLZ381N соответствует части гена VIII; в плазмиде p50FN — фрагменту синтетического гена лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$ (IFN); в плазмиде p0FN — фрагменту гена IFN с делецией инициирующего кодона, инактивирующей экспрессию этого гена (ген IFN'). I—IV — типы сопряжения цистронов C_i и *lacZ* в соответствии с классификацией, приведенной в работе [15]. Терминирующий и инициирующий кодоны цистронов C_i и *lacZ* подчеркнуты снизу и сверху соответственно. SD — последовательность Шайна — Дальгарно. В нижней части рисунка приведены частичные нуклеотидные последовательности (показана структура соответствующей мРНК) ДНК p50F/F1 и p0FN в районе стыка фрагментов генов синтетического лейкоцитарного интерферона $\alpha 2$ (IFN и IFN') и *lacZ*. Иницирующий кодон и сайт SD гена IFN подчеркнуты сверху и снизу соответственно. Участок ДНК от TGT(1) до GAG(96) соответствует последовательности синтетического гена IFN, кодирующей первые 96 аминокислот; штриховой линией подчеркнута синтетическая последовательность адаптера, с помощью которого осуществляли стыковку фрагмента гена IFN с геном *lacZ*; последовательность гена *lacZ* начинается с кодона AAT(5). 16-нуклеотидная делеция (между двумя вертикальными стрелками) в гене IFN' у варианта p0F/F1 показана на структуре ДНК p50F/F1

пользовали серию плазмид, содержащих модельные полицистроны опероны с полусинтетическим геном *lacZ*, для изучения роли этих двух факторов в регуляции трансляции полицистроных мРНК в клетках *E. coli*.

На рис. 1 приведены в общем виде схемы полученных плазмид, содержащих модельные полицистроны четырех типов. Для изменения эффективности трансляции цистрона C_i , предшествующего цистрону $lac Z$, были получены три серии плазмид. В плаزمиде серии pLZ381N, сконструированной нами ранее [15, 18], в качестве цистрона C_i использовали укороченный ген VIII из ДНК фага M13; в плазмиде серии p50FN — фрагмент синтетического гена лейкоцитарного интерферона (IFN); в плазмиде серии pOFN фрагмент гена IFN содержал делецию иницирующего кодона, инактивирующую синтез интерферонового полипептида. Транскрипцию всех полицистронов контролирует промотор p_{VII} (см. рис. 1), гарантируя тем самым одинаковые уровни синтеза соответствующих полицистроновых мРНК, что было доказано прямыми измерениями количества $lacZ$ -специфической РНК, синтезируемой в клетках с плазмидами серии pLZ381N [18].

Для того чтобы полицистроновые мРНК одного типа имели тождественные вторичные структуры в районе инициации трансляции гена $lac Z$, при получении вариантов P50FN и pOFN использовали синтетический адаптер, который встраивали между инициаторным районом гена $lac Z$ и 3'-концом фрагмента гена IFN. Структура этого адаптера была предварительно рассчитана на ЭВМ ЕС-1060 по алгоритму, описанному в работе [19]. Поиск возможных вторичных структур РНК проводили на участке длиной около 600 нуклеотидных остатков (н.о.), каждый раз анализируя район в 70 н.о. и продвигаясь с шагом один нуклеотид в направлении от 5'- к 3'-концу матрицы.

На рис. 2 приведены нуклеотидные последовательности полученных плазмидных ДНК в районе участка инициации трансляции гена $lac Z$. Можно видеть, что каждый тип сопряжения цистронов представлен тремя плазмидами, которые имеют идентичные структуры в области стыка предшествующего цистрона (VIII или IFN) с началом гена $lac Z$. Кроме того, полицистроновые мРНК одного типа могут образовывать одинаковые вторичные структуры в районе инициации трансляции гена $lac Z$ (см. рис. 2). Таким образом, полученный набор плазмид (рис. 1 и 2) представляет собой удобную модель для изучения феномена сопряженной трансляции генов, в частности влияния эффективности трансляции предшествующего цистрона (VIII или IFN) на уровень синтеза β -галактозидазы в зависимости от типа сопряжения этих цистронов.

Дополнительно были получены плазмиды pLZ381/F, p50F/F1 и pOF/F1, которые содержали слитые гены VIII- $lac Z$ и IFN- $lac Z$ соответственно. Гибридный ген VIII- $lac Z$ (плазмида pLZ381/F) кодировал синтез химерной β -галактозидазы, содержащей на N-конце 56 аминокислотных остатков от продукта гена VIII [15]. В варианте p50F/F1 химерная β -галактозидаза содержала на N-конце 96 дополнительных аминокислотных остатков от продукта гена IFN, а в случае pOF/F1 синтез химерного белка не мог происходить из-за делеции в начале гена IFN кодона ATG, с которого в случае плазмиды p50F/F1 иницируется трансляция химерного продукта (см. рис. 1). Известно, что удлинение N-конца β -галактозидазы гетерологичными аминокислотными последовательностями длиной до 300 аминокислотных остатков приводит к незначительным изменениям ее удельной активности [20]. Поэтому можно ожидать, что измерение активности β -галактозидазы у гибридного продукта в вариантах pLZ381/F, p50F/F1 и pOF/F1 отражает эффективность трансляции цистронов VIII и IFN для соответствующих полицистроновых мРНК.

Для подтверждения этого предположения с помощью двух независимых методов определяли количество продуктов синтеза гибридных генов в клетках *E. coli*, несущих плазмиды pLZ381/F, p50F/F1 и pOF/F1. В первом случае измеряли активность β -галактозидазы в соответствующих плазмидо-содержащих клетках по методу Миллера [21] и количество синтезируемого химерного белка рассчитывали, принимая, что 750 ед. акт. по Миллеру соответствуют 0,5% содержанию фермента в суммарном клеточном лизате [22]. Во втором способу процентное содержание β -галактозидазы в клеточном лизате определяли прямым денситометрированием соответ-



Рис. 2. Нуклеотидные последовательности ДНК плазмид pLZ381N, p50FN и pOFN в районе стыка цистронов C_i (VIII, IFN и IFN') и $lacZ$ (приведены последовательности, соответствующие мРНК). Эти последовательности разделены на четыре группы (I—IV), соответствующие типу сопряжения цистронов C_i и $lacZ$ (см. рис. 1). Терминирующий и иницирующий кодоны генов C_i и $lacZ$ подчеркнуты снизу и сверху соответственно. Последовательность сайта SD $_{lacZ}$ подчеркнута снизу. Плазмиды, имеющие идентичные структуры в окрестности стыка цистронов C_i и $lacZ$, расположены друг за другом. Точки обозначают нуклеотиды, идентичные нуклеотидам в верхней последовательности. Горизонтальными стрелками сверху и снизу обозначены районы двойной симметрии, а цифрами указаны свободные энергии соответствующих вторичных структур мРНК (ккал/моль); S1 и S2 — варианты альтернативных структур

вующих дорожек полиакриламидного геля, в котором с помощью электрофореза были разделены белки суммарных лизатов клеток, содержащих плазмиды pLZ381/F, p50F/F1 и pOF/F1.

Оба способа определения количеств синтезируемых продуктов гибридных и нативного гена $lacZ$ (см. таблицу, pLZ381/F, p50F/F1, pOF/F1 и pLZ381) дают близкие величины, что позволяет в единой системе измерений определять эффективность трансляции цистронов VIII, IFN и $lacZ$ с помощью простого метода тестирования ферментативной активности β -галактозидазы.

В таблице представлены результаты определения ферментативной активности β -галактозидазы в клетках *E. coli* CSH36(F⁻), трансформированных плазмидами серии pLZ381N, p50FN и pOFN. Можно видеть, что уровень синтеза β -галактозидазы у разных вариантов полицистронов меняется в зависимости от эффективности трансляции предшествующего цистрона и от типа взаимного расположения терминирующего кодона этого цистрона относительно района инициации трансляции гена $lacZ$ (см. рис. 2 и таблицу). Отсутствие трансляции цистрона IFN' отрицатель-

Относительные уровни синтеза β -галактозидазы в клетках *E. coli* CSH36(F⁻), содержащих плазмиды серий pLZ381N, p50FN и pOFN *

| Плаزمида | Тип сопряжения цистронов C_2 и $lacZ$ | RR | Az | ΔG , ккал/моль |
|--|---|----|---------------------------|---------------------------------------|
| pLZ381/F | Моноцистрон | | 1,0; 0,44 ** 0,35 *** | |
| pLZ381/KpnI ⁻ pLZ381 | I тип II тип | | 1,0 22,2; | -11,5 (13) -11,2 (17) |
| pLZ381/1T pLZ381/19A pLZ381/27A | III тип III тип IV тип | 1 | 2,7 6,8 15,4 | -14,9 (4) -10,5 (36) -19,4 (19) |
| p50F/F1 | Моноцистрон | | 14,6; 13,2 ** 11,1 *** | |
| p50F/KpnI ⁻ p50F | I тип II тип | | 3,8 17,4 | -11,5 (13) -11,2 (17) |
| p50F/1T p50F/19A p50F/27A | III тип III тип IV тип | 15 | 2,1 32,2 18,3 | -14,9 (4) -10,5 (36) -19,4 (19) |
| pOF/F1 pOF/KpnI ⁻ pOF | Моноцистрон I тип II тип | | 0,14 0,45 0,70 | -11,5 (13) -11,2 (17) |
| pOF/1T pOF/19A pOF/27A | III тип III тип IV тип | 0 | 0,28 1,83 0,96 | -14,9 (4) -10,5 (36) -19,4 (19) |

* RR — относительный уровень эффективности трансляции цистрона C_2 , определяемый по активности химерных генов вариантов pLZ381/F, p50F/F1 и pOF/F1 соответственно. Az — эффективность трансляции гена $lacZ$, рассчитанная относительно активности химерного белка (принята за единицу и приблизительно равна 500 ед. акт. по Миллеру). Химерный белок синтезируется pLZ381/F-содержащими клетками. ΔG — свободная энергия вторичной структуры мРНК в районе SD_{lacZ} (см. рис. 2); цифры в скобках соответствуют размеру «петли» (в нуклеотидных остатках) в «шпилька-петлевым» участке мРНК.

** Процентное содержание β -галактозидазы в суммарном клеточном лизате по данным денситометрирования геля (см. «Экспер. часть»).

*** Процентное содержание β -галактозидазы в суммарном клеточном лизате, рассчитанное из данных по активности фермента в этих клетках; принято, что 750 ед. акт. по Миллеру соответствует 0,5% содержанию β -галактозидазы.

но влияет на синтез β -галактозидазы (см. таблицу, серия pOFN, рис. 3), свидетельствуя о том, что в полученных вариантах искусственных полицистронов трансляция гена $lacZ$ сопряжена с трансляцией предшествующего цистрона.

Следует особо отметить, что варианты серии pOFN фактически можно рассматривать как случай независимого способа организации экспрессии гена $lacZ$. Сравнение этих вариантов с соответствующими вариантами серии p50FN показывает (рис. 2 и таблица), что в полицистроне в зависимости от типа сопряжения генов IFN и $lacZ$ уровень экспрессии гена $lacZ$ в 10—25 раз выше, чем в полицистроне без сопряженной трансляции.

Известно, что образование вторичной структуры в иницирующем районе мРНК блокирует инициацию трансляции [23—25]. Поэтому эффект сопряженной трансляции гена $lacZ$ в полицистромах VIII- $lacZ$ и IFN- $lacZ$, по-видимому, обусловливается экранированием последовательности SD_{lacZ} вторичной структурой в межцистронной области полицистронной мРНК (см. рис. 2). Реальное существование этих вторичных структур следует из данных по активности β -галактозидазы в вариантах серии pOFN (см. таблицу, рис. 2 и рис. 3). Действительно, в этом случае наблюдается зависимость между величиной Az и размером «петли» вторичной структуры полицистронной мРНК в районе SD_{lacZ} (рис. 3), который, по-видимому, определяет скорость формирования определенной вторичной структуры [26].

Из совокупности данных по активности гена $lacZ$ в полученном наборе полицистронных вариантов (см. рис. 2 и таблицу) следует, что

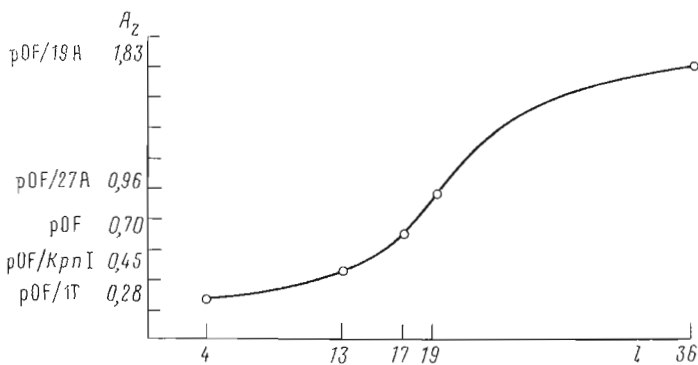


Рис. 3. Зависимость уровня экспрессии β-галактозидазы от размера «петли» локальной вторичной структуры мРНК района инициации трансляции. По оси абсцисс отложена длина «петлевого» участка вторичной структуры мРНК (см. рис. 2) в вариантах полицистронов, кодируемых плазмидами pOF/iT, pOF/KpnI, pOF, pOF/27A и pOF/19A. По оси ординат отложен уровень экспрессии β-галактозидазы в клетках, содержащих соответствующую плазмиду. За единицу измерения экспрессии принят уровень экспрессии β-галактозидазы в клетках, содержащих плазмиду pLZ381/F (см. таблицу)

во-первых, разрушение вторичной структуры РНК в иницирующем районе *lac Z*, происходящее под действием рибосом, транслирующих предшествующий цистрон [5—7, 27], активирует инициацию трансляции гена *lac Z* (сравните варианты pOFN с вариантами pLZ381N и p50FN в таблице); во-вторых, уровень такой активации зависит от расположения терминирующего кодона предшествующего (C_i) цистрона относительно структурированного района мРНК, определяющего инициацию синтеза β-галактозидазы и от степени заселенности этого терминаторного триплета рибосомами, т. е. от эффективности трансляции C_i -цистрона (рис. 1, 2, 4 и таблица); в-третьих, возрастание интенсивности трансляции предшествующего цистрона может оказывать отрицательное или положительное влияние на экспрессию цистрона *lacZ* в зависимости от взаимного расположения терминирующего и иницирующего сигналов этих сопряженных генов (рис. 4).

Таким образом, в настоящей работе создана модельная система для изучения механизмов регуляции сопряженной трансляции полицистроновых мРНК. В качестве тест-гена в модельных полицистронов использовали ген *lac Z*, продукт которого легко тестируется по специфической ферментативной активности β-галактозидазы. Обнаруженный в работе эффект влияния уровня трансляции цистрона C_i на экспрессию гена *lac Z* в составе модельных полицистронов типов I—IV свидетельствует о том, что: а) влияние этого фактора на экспрессию тест-гена существенно зависит от взаимного расположения терминирующего и иницирующего сигналов сопряженных генов (тип сопряжения); б) в регуляции трансляции в рамках I, II и IV типов сопряжения важную роль играет посттерминировавшая рибосома; в) эффективность экспрессии тест-гена (при заданном типе сопряжения) можно регулировать, подавая в зону сопряжения цистронов различные потоки рибосом; г) суммарный выход тест-белка является результатом сложного интерференционного взаимодействия между собой рибосом, расположенных в области сопряжения и находящихся на разных стадиях процесса трансляции, а также их взаимодействия с вторичными структурами этого района. При этом рибосомы, приходящие в область сопряжения, считывая цистрон C_i , способны оказывать не только ингибирующее влияние на инициацию трансляции следующего гена за счет стерического блокирования области инициации, но и активирующее — за счет экспонирования этого участка матрицы. Для точной оценки вклада в экспрессию тест-гена каждого из вышеперечисленных факторов необходимо построение теоретических моделей процессов сопряженной трансляции.

Полученные на модельном полицистроне данные дополняют результаты исследований феномена экспрессии генов в составе искусственных [15,

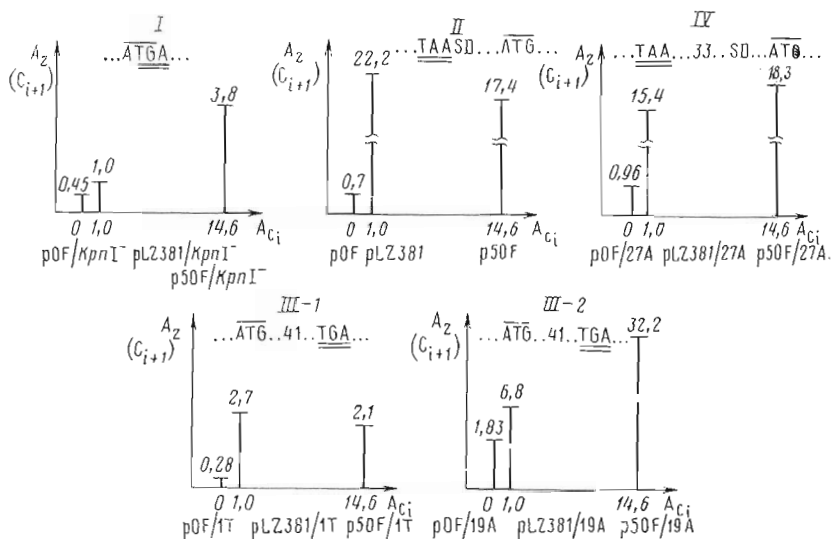


Рис. 4. Зависимость трансляции дистального гена от интенсивности трансляции проксимального гена при разных типах (I—IV) сопряжения цистронов и различных локальных вторичных структурах мРНК района инициации трансляции гена *lacZ*. По оси абсцисс отложена интенсивность трансляции предшествующего цистрона (C_i) в условных единицах (за единицу отсчета выбрана эффективность экспрессии β -галактозидазы в клетках, содержащих плазмиду pLZ381/I⁻). По оси ординат отложена интенсивность трансляции гена *lacZ* (C_{i+1}) в тех же единицах. Схематически представлено взаимное расположение терминирующего и иницирующего кодонов двух соседних цистронов при разных типах сопряжения. Для третьего типа сопряжения приведены данные для двух серий плазмид, различающихся вторичными структурами мРНК (энергия и размер петли) в районе инициации трансляции *lacZ* (см. рис. 2)

16, 18, 28—31] и природных полицистронных мРНК [1, 5—7, 17]. Скопструированный в работе модельный полицистрон благодаря блочному построению отдельных элементов может быть использован как для получения на его основе экспрессионных векторов полицистронного типа, так и для исследования тонких механизмов регуляции трансляции полицистронных мРНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали: штамм *E. coli* CSH36(F⁻) [21], плазмиды pIF6/8 [29], pLZ2 [32] и pLZ381N [18]; рестриктазы *EcoRI*, *XhoI*, *BspI*, *BamHI*, *BglII*, *PstI*, *PvuII*, ДНК-лигазу фага Т4, ДНК-полимеразу I (фрагмент Кленова) из *E. coli* и дезоксинуклеозиды (НИКТИ БАВ, г. Бердск); дезоксинуклеозид 5'-[α -³²P]трифосфаты с уд. акт. 2000—3000 Ки/ммоль и [5'-³H]уридин с уд. акт. 30 Ки/ммоль (Amersham, Англия); *o*-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, АТР, ампициллин и X-gal (Sigma, США); агар, пептон и дрожжевой экстракт (Difco, США). Химический синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе System 1 (Beckman, США), как описано в работе [30].

Общие сведения об эксперименте предварительно описаны в работах [18, 30].

Конструирование плазмид p50FN и pOFN. Плазмиды серии p50FN получали заменой *PstI/EcoRI*-фрагментов ДНК векторных плазмид pLZ381N [18] на *PstI/XhoI*-фрагмент ДНК pIF6/8 [33]. Сшивку *PstI/XhoI*-фрагмента с *PstI/EcoRI*-векторной частью соответствующей плазмиды проводили в присутствии синтетического адаптера, имеющего структуру: верхняя цепь — 5'-TCGAGACAACCTCGCGGTACATTCACCTCG-3'; нижняя цепь — 5'-AATTTCGAGGTGAATGTACCGCGAGTTGTC-3'.

Плазмиды серии pOFN получали на основе вариантов p50FN путем замены у них *PstI/XhoI*-фрагмента, содержащего часть гена IFN, на соответствующий фрагмент, выделенный из ДНК плазмиды pDSLТ. Послед-

няя имеет структуру, аналогичную структуре плазмиды рIF6/8 [29], но содержит делецию в начале гена IFN, удаляющую иницирующий кодон гена (ген IFN').

Нуклеотидные последовательности ДНК р50FN и рOFN в окрестностях инициаторных районов генов IFN, IFN' и *lacZ* приведены на рис. 1 п 2.

Расчет возможных вариантов структур РНК проводили на ЭВМ ЕС-1060 по правилам, указанным в работе [19]. Поиск вторичных структур в различных вариантах мРНК осуществляли на участке длиной 500—600 н.о., каждый раз анализируя фрагмент в 70 н.о. и продвигаясь с шагом один нуклеотид в направлении от 5'- к 3'-концу матрицы. При этом учитывали все вторичные структуры, свободная энергия Гиббса которых была не больше -5 ккал/моль.

Активность β -галактозидазы' в клетках *E. coli* CSH36(F⁻), несущих различные варианты плазмид, определяли в соответствии с протоколом эксперимента, описанным в работе [18]. Стандартная ошибка в этих экспериментах была в пределах 2—3%.

Дополнительно проводили анализ соответствующих клеточных лизатов с помощью электрофореза в 7,5% ПААГ, как указано в работе [33]. Относительное содержание β -галактозидазы и химерных белков (варианты рLZ381/F и р50F/F1) в лизатах определяли с помощью сканирования соответствующих дорожек геля, окрашенного кумаси R-250, на лазерном денситометре Ultrosan XL (LKB, Швеция).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hohn T., Katsura I. Current topics in immunology and microbiology. V. 78. Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 1977. P. 69—110.
2. Newton A., Beckwith J., Zipser D., Brenner S. // J. Mol. Biol. 1965. V. 14. № 2. P. 290—295.
3. Fink G. R., Martin R. G. // J. Mol. Biol. 1967. V. 30. № 1. P. 97—107.
4. Yanofsky C., Ito J. // J. Mol. Biol. 1966. V. 21. № 2. P. 313—334.
5. Oppenheim D. S., Yanofsky C. // Genetics. 1980. V. 95. № 4. P. 785—795.
6. Schünperli D., Mckeeney K., Sobienski D. A., Rosenberg M. // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 865—871.
7. Baughman G., Nomura M. // Cell. 1983. V. 34. № 3. P. 979—988.
8. Sarabhai A., Brenner S. // J. Mol. Biol. 1967. V. 27. № 1. P. 145—162.
9. Newton A. // J. Mol. Biol. 1969. V. 42. № 2. P. 329—339.
10. Napoli C., Gold L., Singer B. S. // J. Mol. Biol. 1981. V. 149. № 3. P. 433—449.
11. Cone K., Steege D. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 4. P. 733—742.
12. Hiraga S., Yanofsky C. // J. Mol. Biol. 1972. V. 72. № 1. P. 103—110.
13. Schneider E., Blundell M., Kennell D. // Mol. Gen. Genet. 1978. V. 160. № 1. P. 121—129.
14. Berkhout B., Schmidt B. F., Strien van A., Boom van J., Westrennen van J., Duin van J. // J. Mol. Biol. 1987. V. 195. № 3. P. 517—524.
15. Кравченко В. В., Шамин В. В., Гилева И. П., Лихошвай В. А., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 3. С. 745—748.
16. Schottel B., Sninsky J. J., Cohen S. N. // Gene. 1984. V. 28. № 2. P. 177—191.
17. Berkhout B., Kastelein R. A., Duin van J. // Gene. 1985. V. 37. № 1—3. P. 171—179.
18. Кравченко В. В., Шамин В. В., Гилева И. П., Лихошвай В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1372—1386.
19. Jacobson A. B., Good L., Simonetti J., Zuker M. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 1. Part 1. P. 45—52.
20. Fowler A. V., Zabin I. // J. Biol. Chem. 1983. V. 286. № 23. P. 14354—14358.
21. Miller J. H. // Experiments in molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1972. P. 325—355.
22. Weinstock G. M., Berman M. L., Silhavy T. J. // Gene amplification and analysis. V. 3 / Eds Papas T. S., Rosenberg M., Chirikjian J. G. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1983. P. 27—64.
23. Lodish H. F., Robertson H. D. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1969. V. 34. P. 655—673.
24. Steitz J. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. № 4. P. 2605—2609.
25. Stanssens P., Remaut E., Fiers W. // Gene. 1985. V. 36. № 3. P. 211—223.
26. Mironov A., Kister A. // J. Biomolecular Structure and Dynamics. 1986. V. 4. № 1. P. 1—9.
27. Cone K., Steege D. // J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 4. P. 725—732.
28. Кравченко В. В., Шамин В. В., Гилева И. П., Лихошвай В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 301. № 4. С. 480—483.

29. Гилева И. П., Мизенко Г. А., Серпинский О. И., Аммосов А. Д., Кравченко В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 3. С. 734—737.
30. Кравченко В. А., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1176—1185.
31. Машко С. В., Липидус А. Л., Лебедева М. И., Подковыров С. М., Плотников Т. Г., Козлов Ю. И., Ребентиш Б. А., Костров С. В., Рыжовская А. С., Стронгин А. Я., Свердлов Е. Д., Дебабов В. Г. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 6. С. 1491—1496.
32. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Игуен К. В., Подладчикова О. Н., Северцова И. В., Быстров Н. С., Болдырева Е. Ф., Чувпило С. А., Колосов М. Н. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1285—1289.
33. Кравченко В. В., Ямщиков В. Ф., Плетнев А. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 523—533.

Поступила в редакцию
22.11.1990

V. V. KRAVCHENKO, V. V. SHAMIN, I. P. GILEVA, V. A. LIKLOSHWAI,
S. K. KORGENEVSKI, V. N. DOBRYNIN*, [S. A. FILIPPOV*], S. A. CHUVPILLO*,
V. G. KOROBKO*

MODEL POLYCISTRONIC OPERON FOR STUDY ON COUPLED
TRANSLATION IN *ESHERICHIA COLI* CELLS. THE ROLE
OF STREAM OF RIBOSOMES

Science and Production Association «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region:

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

The role of «stream» of ribosomes upon translation of polycistronic mRNAs has been studied using an artificial polycistron. It has been found that the levels of activation of cistron C_{i+1} out of two adjacent cistrons (C_i and C_{i+1}) depends, in addition to earlier described effects of mutual arrangement of initiation and termination signals, also on efficiency of translation of the foregoing cistron C_i . The results obtained lead to the conclusion that in polycistronic systems the levels of translation of cistron C_{i+1} can be regulated by «stream» of ribosomes resulted from translation of the proximal cistron C_i .