

Измененные фрагменты гена, введенные в клетку в составе плазмид, как и в случае с трансдуцирующими фагами, способны рекомбинировать с гомологичными участками бактериальной хромосомы, благодаря чему достигается включение измененного фрагмента в бактериальный геном.

Приведенные примеры свидетельствуют о том, что многие важные направления в современной биологии не могли возникнуть, если бы не генетические исследования микроорганизмов.

ВНИИ Генетика, Москва

Поступила 11.XI 1984 г.

ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱՅԻ ԳԵՐԸ ԿԵՆՍԱՐԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏՈՒԱԼ ՊՐՈԲԼԵՄՆԵՐԻ ԶԱՐԳԱՑՄԱՆ ՄԵԶ

Ս. Ի. ԱԼԻԿԽԱՆԻԱՆ

Հոդվածում ամփոփված են միկրոօրգանիզմների գենետիկայի բնագավառում կատարված ուսումնասիրությունների առաջիկ նշանակալից արդյունքները, որոնք կարևոր դեր են խաղում գենային ինժեներիայի, էուկարիոտների մոլեկուլյար կենսաբանության մեջ:

ROLE GENETICS OF MICROORGANISMS IN THE DEVELOPMENT OF ACTUAL PROBLEMS OF BIOLOGY

S. I. ALIKHANIAN

The significant results of investigations in the sphere of genetics of microorganisms playing an important role in the development of gene engineering, molecular biology of eucaryotes are summed up.

«Биол. ж. Армения», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.1:576.851.48

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ В ПРОКАРИОТАХ

В. А. САКАНЯН

Рассматриваются факторы, препятствующие экспрессии гетерологичных генов бактерий в прокариотных системах на стадиях транскрипции и трансляции. Особое внимание уделено сравнительной организации транскрипционных и трансляционных сигналов различных бактерий. Обсуждаются также пути преодоления биологических барьеров для достижения экспрессии гетерологичных генов.

Ключевые слова: генная инженерия, экспрессия генов, транскрипция, трансляция.

Проблема гетерологичной экспрессии бактериальных генов остро стоит при генноинженерном конструировании штаммов-продуцентов биологически активных веществ. Интерес к ней особенно возрос в связи с привлечением в сферу биотехнологии представителей рода *Bacillus*, имеющих ряд преимуществ перед другими микроорганизмами. Показано, что экспрессия генов грамотрицательной природы невозможна в клетках бацилл [16, 34, 47, 76, 96]. В то же время хорошо документирована возможность экспрессии генов грамположительной природы в клетках грамотрицательных бактерий [25, 33, 35, 95, 105]. Асимметричный характер экспрессии генов в разных микроорганизмах предполагает фундаментальные различия в каких-то внутриклеточных процессах, выступающих в роли биологических барьеров экспрессии генов. Априори можно допустить, что эти барьеры обусловлены разными уровнями реализации генетической информации: транскрипцией, трансляцией, посттрансляционной модификацией синтезируемых продуктов, стабильностью промежуточных (мРНК и препептидов) и конечных продуктов (РНК и белков). Очевидно, для функциональной экспрессии гена наиболее важно соответствие транскрипционных сигналов гетерологичной ДНК и/или трансляционных сигналов гетерологичной мРНК с компонентами транскрипционного и трансляционного аппаратов нового хозяина, обеспечивающих узнавание этих сигналов.

Настоящий обзор посвящен освещению факторов, определяющих или потенциально могущих влиять на экспрессию гетерологичных генов бактерий в прокариотных системах на стадиях транскрипции и трансляции. Литературные данные преимущественно касаются двух неродственных родов — *Enterobacteria* и *Bacillus*, представляющих два разных типа бактерий, окрашиваемых по Граму. Известно, что разделение бактерий на грамотрицательные и грамположительные отражает фундаментальные различия клеток в отношении архитектуры и химии их клеточной стенки [13]. Как будет показано в дальнейшем, этот таксономический критерий в какой-то степени может отражать различия и в таких важных процессах, как транскрипция и трансляция. Вопросам гетерологичной экспрессии генов посвящены и другие обзоры [1, 2, 34].

РНК-полимеразы. ДНК-зависимая РНК-полимераза представляет собой многосубъединичный фермент, который может состоять из двух активных форм — холофермента $\alpha_2\beta'\sigma$ и корфермента $\alpha_2\beta'$, которые в дальнейшем будут обозначаться как E_0 и E соответственно. Наиболее подробно фермент изучен у *E. coli*. Функциональная активность между субъединицами РНК-полимеразы распределяется следующим образом. Субъединица β содержит каталитический сайт синтеза РНК и связывающие сайты для субстратов и образующихся продуктов; β' обеспечивает связывание матрицы; α собирает эти большие субъединицы в корфермент, а σ позволяет образующемуся холоферменту узнавать промоторные участки ДНК и инициировать правильный и эффективный синтез РНК. Однако следует иметь в виду, что такое распределение функций между субъединицами в определенной степени условно и между ними имеется более интимная взаимосвязь [79, 106, 110].

Сборка РНК-полимеразы идет по стадиям $2\alpha \rightarrow \alpha_2$; $\alpha_2 + \beta \rightarrow \alpha_2\beta$; $\alpha_2\beta + \beta' \rightarrow \alpha_2\beta\beta'$; $\alpha_2\beta\beta' + \omega \rightarrow \alpha_2\beta\beta'\omega$. Присоединение σ -субъединицы к корферменту существенно не меняет его общей пространственной структуры, которая имеет важное значение в узнавании промотора [66]. При высокой ионной силе E_0 , представленный в виде мономера, эффективно транскрибирует многие матричные ДНК. При низкой ионной силе молекулы полимеразы агрегируют в димеры, которые способствуют инициации транскрипции с промотором, направляющих синтез стабильных РНК [140]. Следовательно, эффективность экспрессии конкретных генов по крайней мере в условиях *in vitro* может зависеть от кратности молекулы РНК-полимеразы, считывающей матрицу.

РНК-полимеразы филогенетически далеких от *E. coli* бактерий имеют идентичную структурную организацию [3]. Однако РНК-полимераза бактерий рода *Bacillus* характеризуется рядом отличий, основным из которых с позиций настоящего обзора является наличие множества σ -подобных факторов, обозначаемых σ^x , где «х» означает молекулярный вес полипептида или соответствующий ему ген. Основным σ -фактором у *B. subtilis* является σ^{55} [123]. Кроме него обнаружены еще четыре минорных σ -подобных фактора — σ^{28} [148], σ^{29} [51], σ^{32} [68], σ^{37} [50], кодируемые хромосомой *B. subtilis*, два σ -подобных фактора — σ^{23} [137], σ^{33} [38], кодируемые фагом SP01, а также другие ассоциированные с корферментом факторы — δ [111], ω [32] и ρ [39].

Анализ пептидных карт минорных σ -подобных факторов σ^{27} , σ^{29} и полипептидов P^{23} , P^{34} и δ показал, что они не являются продуктами протеолитической деградации основного σ^{55} -фактора [152]. Более того, все эти факторы не имеют иммунологического сродства с σ^{55} . В противоположность этому между основными σ -субъединицами РНК-полимераз *B. subtilis* и *E. coli* имеется значительная структурная гомология, что свидетельствует о консервативности определенных доменов этих субъединиц у эволюционно далеко отстоящих бактерий.

Ген, кодирующий σ^{28} [26], удалось отклонировать и изучить детально [26]. Оказалось, что в кодирующей последовательности гена не имеется какой-либо гомологии с геном *groD*, кодирующим σ -субъединицу РНК-полимеразы *E. coli*.

Соотношение холоферментов, содержащих какой-либо из σ -факторов, определяется физиологическим состоянием клетки. В спорулирующих клетках минорные формы могут составлять до 20% общей ферментативной активности, тогда как в вегетативных клетках только 1—5% [30]. В вегетативных клетках присутствуют холоферменты, содержащие σ^{55} , σ^{28} , σ^{29} и σ^{37} , на ранних стадиях споруляции клеток — σ^{55} и σ^{37} , а на более поздних стадиях — σ^{28} и σ^{29} [92]. При ухудшении условий питания (недостатке углерода, азота и пр.) клетки *B. subtilis* вступают на путь разнотия эндоспоры (спорогенез представляет собой простую форму клеточной дифференциации). Этот процесс состоит из пяти этапов с вовлечением соответствующих им классов генов. Начинается споруляция с функций регуляторных *spoO* генов. При инициации спорогенеза совместно с продуктами *spoO* генов участвуют σ^{37} и

σ^{52} -факторы [156]. Возможно, продукты генов *spoO*, связываясь с промоторами гена *spoVG*, которые узнаются σ^{37} и σ^{52} -факторами, способствуют синтезу споруляционно-специфичной РНК [12]. По прошествии ~1 часа σ^{55} и σ^{37} заменяются в холоферменте на σ^{52} [51], индукция которого является специфичным для споруляции актом, так как эта замена находится под контролем *spoO* генов. Таким образом, при споруляции наблюдается каскадный характер проявления ферментативной активности РНК-полимеразы [92].

Другой аналогичный пример связан с развитием фага SP01 в клетках *B. subtilis*. Показано, что ранние гены фага транскрибируются с помощью σ^{55} , средние гены включаются под действием σ^{8128} , а в середине литического цикла $\sigma^{8133-31}$ запускает поздние гены [92].

Возможно, гетерогенность РНК-полимераз является общим свойством бактерий рода *Bacillus*. Во всяком случае, в спорулирующих клетках *B. thuringiensis* обнаружены две новые формы *E σ* , отличающиеся по субъединичному составу и некоторым каталитическим свойствам от фермента, выделенного из вегетативных клеток [72].

Так, как σ -подобные белки ассоциированы с одним и тем же корферментом, то при каскадной регуляции экспрессии генов разными РНК-полимеразами должен существовать механизм, обеспечивающий замену σ -факторов. Этот до конца невыясненный механизм может осуществляться либо путем конкурентных взаимодействий самих σ -подобных полипептидов, либо благодаря функционированию дополнительного фактора.

При анализе образцов транскриптов, промотированных с ранних и средних генов фага SP01, установлено, что связывание σ^{55} и σ^{8128} с *E* взаимноисключаемо [22]. Скорость связывания σ^{55} и σ^{8128} субъединиц с соответствующими промоторами зависит от температуры и ионной силы. Изменение ионной силы влияет и на конкурентное связывание этих субъединиц со своими промоторами. При общей ионной силе <0.2 М кинетика связывания σ^{55} преобладает над таковой для σ^{8128} , при ионной силе >0.2 М — наоборот. Хотя и с невысокой скоростью, σ^{8128} способен переводить *E σ^{55}* в форму *E σ^{8128}* , и такая направленность реакции превалирует над переходом *E σ^{8128}* в форму *E σ^{55}* . В условиях формирования «открытых» комплексов с ранними промоторами фаговой ДНК переход *E σ^{55}* в форму *E σ^{8128}* ингибируется [22].

В спорулирующих клетках *B. subtilis* к тому же обнаружен некий фактор, способствующий диссоциации σ^{55} и σ^{37} от холофермента [50]. При этом не происходит необратимой инактивации σ^{55} -фактора, так как он может быть восстановлен в активную форму экстрактом из спорулирующих бактерий. Диссоциация σ^{55} от холофермента предотвращается мутациями в некоторых *spoO* регуляторных генах, что говорит о контроле синтеза этого фактора со стороны споруляционного аппарата клетки [92].

Из клеток, инфицированных фагом SP01 [111] или SP82 [83], выделен так называемый δ -фактор, представляющий собой полипептид с молекулярным весом 21.000 [111]. Этот полипептид при очистке ин-

когда не находится в ассоциации с каким-либо из σ -факторов [30]. Влияние δ -фактора на транскрипцию зависит от соотношения фермента и ДНК и использованной матрицы. Фактор δ уменьшает неспецифическую транскрипцию с концов рестрикционных фрагментов [30], присутствие его в реакционной смеси приводит к синтезу специфических транскриптов фаговой ДНК [8] и повышает скорость диссоциации полимеразы от неспецифических комплексов с фаговой ДНК [127]. Несмотря на то, что δ -фактор не связывается с ДНК [80], он может вытеснять σ из холофермента и образовывать комплекс $E\delta$, который не обладает ферментативной активностью [151]. Эти данные указывают на то, что δ -фактор функционирует до стадии инициации транскрипции. Наиболее реальным представляется, что δ фактор уменьшает неспецифическое связывание РНК-полимеразы путем диссоциации фермента от непромоторных сайтов (эту функцию у *E. coli* выполняет преимущественно σ -субъединица). Предположение, что δ -фактор может способствовать физиологическому переходу одного типа холофермента и другой при каскадной регуляции экспрессии генов, не подтвердилось [22].

Корреляция между появлением σ -подобных регуляторных полипептидов и стадией споруляции или развития вириона хорошо согласуется с данными о различной промоторной специфичности этих полипептидов.

Промоторы. На рис. показана последовательность усредненного промотора *E. coli*. В этой структуре можно выделить следующие особенности: асимметрия последовательности, что отражает первичную

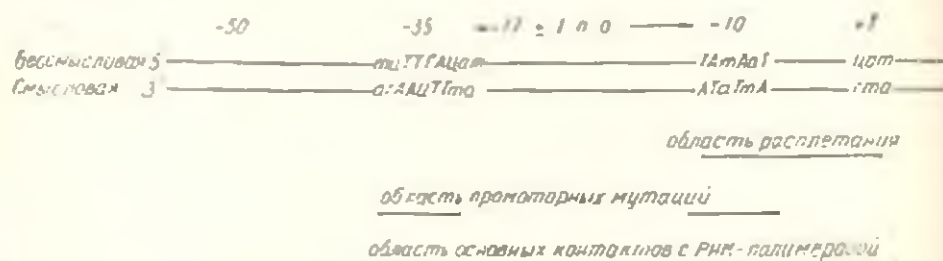


Рис. Структура усредненного промотора, узнаваемого РНК-полимеразой *E. coli*.

функцию промотора — инициацию мРНК в правильном направлении и со смысловой или матричной ДНК [143]; наличие двух консервативных участков —10 и —35 [112, 115]; наличие специфичной последовательности между участками длиной 17 ± 1 пар оснований (п. о.) [55, 113].

Из результатов генетических, биохимических и физических исследований следует, что в функциональном отношении наиболее важными в промоторе являются —10 и —35 участки [55, 113, 143]. Сила промотора определяется как скоростью формирования и стабильностью «открытого» комплекса полимеразы с промотором, так и скоростью инициации транскрипции. Поскольку эти характеристики во многом зависят от структуры промотора, то по крайней мере три его параметра — после-

довательности —10 и —35 участков [29, 113, 133] и длина спейсера между ними [113, 114]—могут влиять на силу промотора.

Мутации, уменьшающие гомологию консервативных участков относительно усредненных последовательностей, снижают силу промотора [55, 113]. При этом взаимные замены Г-Ц на А-Т в различных позициях консервативных участков существенным образом не отражаются на силе промотора [145]. Однако близость структур —10 и —35 участков к последовательностям усредненного промотора еще не гарантирует высокой активности промотора [70]. Возможно, отклонения от усредненных консервативных участков у «нетипичных» промоторов компенсируются какими-то особенностями последовательности неконсервативных участков промотора.

У природных промоторов длина спейсера колеблется от 15 до 20 п. о. Но в 100 из 112-ти исследованных случаев она равна 16—18 п. о. [55]. Изменение длины спейсера в любую сторону уменьшает активность промотора [9, 114].

РНК-полимераза *E. coli* более или менее плотно покрывает участок ДНК длиной ~70 п. о. (от —50 до +20 позиций), и фермент больше контактирует с —10 и —35 участками смысловой нити [6, 109, 117, 124, 125]. Связывание полимеразы с более протяженным участком, чем длина —10, —35 и спейсера вместе взятых, свидетельствует о существовании дополнительных последовательностей, функционально важных при взаимодействии с ферментом. Одним из таких участков может быть район стартовой точки транскрипции, который также характеризуется относительной консервативностью [116]. Кроме того, в сильных промоторах фагов *E. coli* обнаружены еще три консервативных участка: —43 с последовательностью AAAA, +1 с последовательностью ЦАТА и +7 с последовательностью ТТГА. Район ДНК, расположенный между —50 и +25 позициями, характеризуется к тому же высоким содержанием АТ пар [18].

Хотя число секвенированных промоторов грамположительных бактерий невелико, общая картина их организации вырисовывается довольно четко. В табл. 1 представлены последовательности промоторных районов ДНК различных грамположительных бактерий, анализ которых позволяет сделать ряд заключений.

Промоторы грамположительных бактерий также имеют консервативные —10 и —35 участки. Функциональная важность этих участков подтверждена экспериментально [100, 101, 138].

Последовательности консервативных участков, специфичные для четырех исследованных σ -субъединиц РНК-полимеразы *B. subtilis*, гомологичны внутри своей группы, но отличаются друг от друга. Если в —10 участке промоторов, специфичных для σ^{33} , σ^{37} (возможно и σ^{49}) и σ^{54} , еще есть намек на консервативность некоторых нуклеотидов (например, «инвариантный» Т в шестой позиции при совмещении последовательностей), то в —35 участке вообще не наблюдается какого-либо консерватизма. Из этого правила условно можно выделить два исключения: отсутствие типичного —35 участка в промоторе гена *spoVC*,

Последовательности промоторов грамположительных бактерий

Источник	Последовательности	Экспрессия в системе <i>E. coli</i>		Ссылки
		In vitro	In vivo	
1	2	3	4	5
Ранние гены фагов D. s.	специфичные для σ^{55} фактора			
SP01-26	AAAGTTTGTGA ¹ TTTATCTA ² CAAGG ³ TTG ⁴ TGATAA ⁵ TAA ⁶ GT ⁷ TAA ⁸ C	+		[85]
SP01-15	AAAGTTATTGA ¹ CTTTTTC ² TACAG ³ TCTGT ⁴ TAA ⁵ TAA ⁶ TGA ⁷ ATT ⁸ CA			[84]
29-G3b	AAAAGTTT ¹ T ² AAAAT ³ TTGA ⁴ ACA ⁵ TTT ⁶ TATATA ⁷ TAAAA ⁸ AGTA	+		[104, 28]
29-G2	AAAAGTTAGA ¹ CAAA ² CTAT ³ CTTTAA ⁴ CA ⁵ TCTTATA ⁶ CTATA ⁷ ATA ⁸ GA	+		[104, 28]
29-A1	TAA ¹ TCTTTGA ² CAAA ³ CTATTAA ⁴ AGAT ⁵ CTATA ⁶ ATCT ⁷ TAGTAT ⁸ CT	+		[104, 28]
SP92-32	ATA ¹ TTAT ² TGA ³ CTTCT ⁴ CTCA ⁵ CAAT ⁶ TTCTCA ⁷ ATA ⁸ ATGATA ⁹ CTAA ¹⁰ C			[149]
Хромосомные гены				
<i>B. s. veg</i>	ATTTTATTTGA ¹ CAAAA ² ATGTTCT ³ CTCTTTCTA ⁴ CAATA ⁵ AAAT ⁶ CTAGT	+		[102]
<i>B. s. lms</i>	AGTCTCTTTGA ¹ AAAT ² CAAGA ³ CATATTTAG ⁴ TATATTTTCTAT ⁵ CTG	+		[102]
<i>B. s. spoOH</i>	GATTA ¹ GTTGA ² CTCTTTTCT ³ CTATTA ⁴ CTTTATA ⁵ ATATTCTAT ⁶ CT			[102]
<i>B. s. spoOF</i>	ATTCTGTTGA ¹ CTTTCTAT ² CTCTCTTAA ³ TTATA ⁴ ATAGTCTAT ⁵ CT			[121]
<i>B. s. β-глюконаза</i>	CAATTATTTGA ¹ CTGAT ² TTCTTTCTGA ³ AGAA ⁴ CTATGTA ⁵ AGAT ⁶ CT		+	[103, 20]
<i>B. l. pen</i>	AAAACTTTG ¹ CAATT ² AAAT ³ CTGA ⁴ CAAT ⁵ TAA ⁶ ATCTTCA ⁷ AAAG ⁸ AC		+	[78, 81]
<i>B. l. ? (pBT10)</i>	ATTAA ¹ TTTGA ² CAAT ³ TTG ⁴ AAAA ⁵ AGAT ⁶ AGAT ⁷ CTAT ⁸ CTAT ⁹ CT	+	+	[5]
<i>S. a. spa</i>	ATAGATTTTAT ¹ CTAT ² CTCA ³ ATA ⁴ ATAAT ⁵ CTTATAT ⁶ ATAT ⁷ ATGA ⁸ CT		+	[91]

узнаваемого σ^{37} -фактором [101], и отсутствие типичного —10 участка в структуре σ^{32} -специфичных промоторов [68].

Только —10 и —35 участки, узнаваемые σ^{55} -фактором *B. subtilis*, гомологичны консервативным участкам промоторов *E. coli*. Более того, матричная ДНК из *B. subtilis*, содержащая σ^{55} -специфичный промотор, эффективно транскрибируется РНК-полимеразой *E. coli* [85]. И наоборот, промоторы *E. coli* могут утилизироваться σ^{55} -фактором *B. subtilis* [28, 67]. Основные σ -субъединицы *E. coli* и *B. subtilis* при замене своих кофакторов сохраняют специфичность узнавания промоторов [7, 123]. Гены, транскрибируемые с σ^{55} -специфичных промоторов, функционально экспрессируются в клетках *E. coli* (табл. 1). В отношении промоторов, специфичных для минорных σ -субъединиц, слабая экспрессия в *E. coli* недавно показана только для σ^{32} -специфичного промотора [153]. Эти данные и факт большого сродства σ^{55} *B. subtilis* и σ -субъединицы *E. coli* позволяют констатировать, что эти компоненты РНК-полимеразы неродственных бактерий по своей структуре, функциям и промоторной специфичности во многом идентичны.

В исследованных случаях инициирующий транскрипцию нуклеотид, как и у *E. coli*, располагается на расстоянии 6–9 п. о. от —10 участка. Наиболее часто инициирующим нуклеотидом является пурин [102]. Непосредственно +1 позиции (безотносительно от того, что она является сайтом инициации транскрипции, так как в половине случаев истинный сайт не определялся) предшествует А или Т. Район между —12 и +1 позициями также богат АТ-основаниями, что может иметь значение с точки зрения локального расплетания ДНК вблизи сайта инициации транскрипции.

Длина спейсера между —10 и —35 участками промоторов *B. subtilis* равна 17 п. о., что сравнимо с таковой *E. coli*. Однако в промоторе гена, кодирующего дифтерийный токсин, длина спейсера равна всего 12 п. о. [69]. Еще в двух промоторах *B. thuringiensis* длина спейсера равна 15 п. о. [5, 74], а в трех промоторах средних генов фага SPO1—19 п. о. [84, 138]. Спейсер между —10 и —35 участками промоторов *B. subtilis* характеризуется еще одной особенностью—наличием консервативной последовательности TTTTG от —17 до —14 позиций [102].

У многих промоторов грамположительных бактерий район, предшествующий —40 позиции, богат олиго- (дА) и (или) олиго- (дТ) основаниями [102]. Это наиболее ярко выражено у промоторов, узнаваемых σ^{56} -фактором, и в особенности у сильных промоторов ранних фаговых генов. В участке ДНК от —29 до —27 также чаще встречаются А и Т.

Несмотря на жесткую специфичность узнавания промоторов, σ -факторы *B. subtilis* характеризуются определенной функциональной пластичностью. Холофермент $E\sigma^{37}$ с низкой эффективностью транскрибирует гены, имеющие σ^{32} -специфичные промоторы [100]. В свою очередь холофермент $E\sigma^{29}$ транскрибирует гены, имеющие σ^{37} -специфичный промотор. Кроме того, σ^{29} может осуществить транскрипцию с интеробактериальной ДНК плазмиды рМВ9, промоторы которой не

узнаются ни σ^{70} , ни σ^{32} [51]. Возможно, он характеризуется менее строгой специфичностью узнавания промоторов по сравнению с другими σ -факторами *B. subtilis*.

На специфичность узнавания промотора могут влиять такие условия *in vitro* анализируемой системы, как концентрация солей, присутствие глицерина и т. д. [21]. Поэтому для однозначной интерпретации данных о структурной и функциональной организации транскрипционных сигналов грамположительных бактерий необходимы не только анализ большего числа промоторов, но и использование сравнимых условий реакции.

Терминаторы. У *E. coli* различают два типа терминаторов — независимые и фактор-зависимые [60]. Независимые терминаторы имеют ГЦ-богатый участок длиной 20 п. о., который имеет внутреннюю зеркальную симметрию и поэтому способен образовывать структуру типа петли. Транскрипция обычно завершается в пределах участка из остатков тимидилата в нематричной нити ДНК, который расположен сразу же за структурой потенциальной петли [113]. Решающее значение в терминации больше имеет формирующаяся петля транскрибируемой РНК, чем ДНК.

У фактор-зависимых терминаторов синтез РНК завершается при участии дополнительных факторов — Rho и Nus [60]. Эксперименты *in vitro* с использованием в качестве матриц синтетических молекул ДНК не выявили строгой селективности взаимодействия Rho с последовательностью РНК при терминирующей реакции [120]. Несмотря на то, что между отдельными фактор-зависимыми терминаторами прослеживается гомология, четкой закономерности в организации их структуры пока не выявлено.

У грамположительных бактерий анализ участков ДНК, представляющих собой терминаторы или сайты торможения продвижения РНК-полимеразы, не выявил каких-либо отличий от структуры независимых терминаторов *E. coli* [17, 49, 103, 121, 126]. Кроме того, РНК-полимеразы *B. subtilis* и *E. coli* терминируют транскрипцию в одних и тех же сайтах бациллярных матричных ДНК, и в обоих случаях эффективность терминации увеличивается с повышением ионной силы [28]. У *B. subtilis* также обнаружен Rho-фактор [61].

Таким образом, в терминирующих сигналах транскрипции грамположительных и грамотрицательных бактерий пока не обнаружено принципиальных различий.

Факторы, ограничивающие транскрипцию гетерологичных генов бактерий. Эффективность инициации транскрипции РНК-полимеразой *B. subtilis* ниже и сильно варьирует в зависимости от использованных гетерологичных промоторов грамотрицательной природы по сравнению с транскрипцией с гетерологичных матриц грамположительной природы РНК-полимеразой *E. coli* [85, 102, 147]. В лимитированных количествах фермент из *B. subtilis* в 30 раз эффективнее промотирует синтез РНК с гомологичного промотора раннего гена фага SP01, чем с *lacUV5* промотора *E. coli*, тогда как полимеразы из *E. coli* синтезируют РНК на этих же матрицах примерно с одинаковой эффективностью

[85]. Аналогично РНК-полимераза *B. subtilis* слабо утилизирует гибридный промотор *tac* [102], состоящий из —35 участка гена *trp* и —10 участка гена *lacI* V5 [29]. не транскрибирует энтеробактериальные гены *bla* и *cat* [77], но холофермент *E. coli* с одинаковой для фермента из *B. subtilis* эффективностью промотирует синтез РНК с бациллярных генов *veg* и *lms* [102]. Слабое взаимодействие РНК-полимераз из грамположительных бактерий *B. subtilis* и *L. curvatus* показано и в отношении промоторов фага T7 [147].

Транскрипция РНК-полимеразой из *B. subtilis* на гетерологичных матрицах ДНК фагов T4, T7 и с *lacI* V5 промотора, в отличие от гомологичных матриц фаговой ДНК, очень чувствительна к полной силе [27, 85, 123]. На матрице ДНК фагов Ø29 и SPØ1 фермент из *B. subtilis* в присутствии рифампицина и нуклеотидтрифосфатов эффективно инициирует синтез специфических РНК [31], тогда как транскрипция с матрицы ДНК фага T7 этим же ферментом очень чувствительна к рифампицину. В противоположность этому холофермент из *E. coli* в этих же условиях на тех же матрицах образует быстрорастущие комплексы [147].

РНК-полимераза *B. subtilis* в оптимальных условиях *in vitro* с ранних генов фага Ø29 промотирует синтез 5-ти видов РНК [28]. Фермент из *E. coli* дополнительно синтезирует еще три вида транскриптов, которые встречаются и в инфицированных фагом клетках *B. subtilis*. Однако при соотношении фермента к ДНК более чем 10 к 1 и в отсутствие конкурирующих промоторов полимеразы из *B. subtilis* способна инициировать транскрипцию еще с двух промоторов, используемых ферментом *E. coli*. При этом транскрипция с них чувствительна к рифампицину. Следовательно, эти промоторы в отношении полимеразы *B. subtilis* ведут себя так же, как промоторы фага T7. Если учесть, что промоторы ранних генов фага Ø29 в общем идентичны таковым грамотрицательных бактерий, то можно допустить, что различия во взаимодействии с промоторами между ферментами *E. coli* и *B. subtilis* связаны не со специфичностью связывания с промотором, а со способностью взаимодействовать с промоторами разной силы [28].

Существенную роль в эффективности взаимодействия с гетерологичным промотором играет корфермент РНК-полимеразы. Во всяком случае, корфермент *E. coli* в присутствии σ -субъединицы *B. subtilis* эффективно транскрибирует ДНК фагов Ø29 и T7 с образованием тех же видов РНК, которые образуются с помощью холофермента *E. coli* [28]. В противоположность этому гетероспецифическая комбинация корфермента *B. subtilis* и σ -субъединицы *E. coli* на матрице фаговых ДНК *E. coli* характеризуется слабой активностью [28, 123]. Следовательно, корфермент содержит элементы, важные в детерминации относительной силы промотора. Отражают ли эти элементы какие-то конформационные изменения корфермента в результате взаимодействия с σ -субъединицей, что может влиять на скорость формирования «открытого» комплекса, или другие изменения, лимитирующие расплетание ДНК, пока остается неясным.

Различие в специфичности взаимодействия с гетерологичным промотором может быть связано и с σ -фактором [7, 36, 155]. Возможно, бактериальные промоторы имеют какие-то структурные особенности, существенные при взаимодействии с РНК-полимеразой. Очевидно, что холофермент из *B. subtilis*, содержащий минорную σ -субъединицу, не будет утилизировать энтробактериальный промотор из-за разницы в последовательности консервативных участков, узнаваемых σ -субъединицей *E. coli* и минорными σ -субъединицами *B. subtilis* [148]. Вероятно, это утверждение верно и в отношении возможности транскрипции РНК-полимеразой *E. coli* с промотором, специфичных для большинства, если не всех минорных σ -факторов *B. subtilis*.

Высказано предположение, что для экспрессии гена в клетках *B. subtilis* в отличие от *E. coli* необходимо более жесткое соответствие транскрипционных сигналов ДНК с РНК-полимеразой [102]. Это предположение подтверждается рядом экспериментальных данных. Промотор *lacUV5*, имеющий нетипичный для σ^{54} -специфичных промоторов —35 участок ТТТАЦА слабо используется РНК-полимеразой *B. subtilis* [85]. Аналогично энтробактериальные промоторы генов *bla* и *cat*, имеющие последовательности ТТЦААА и ГГЦАЦГ в —35 участках и ГАЦААТ и ЦАТААТ в —10 участках соответственно, не транскрибируются в клетках *B. subtilis* [77]. Кроме того, хромосомный ген кристаллического токсина *B. thuringiensis*, имеющий промотор с атипичным —35 участком ЦЦТАЦГ, не транскрибируется полимеразой негетеротрофных клеток *B. subtilis* [71] и даже полимеразой *E. coli* [71, 74], характеризующейся меньшей избирательностью в отношении консервативных участков.

Важность степени гомологии консервативных участков гетерологичного промотора с консервативными участками σ^{54} -специфического промотора для экспрессии гетерологичного гена в бактериях вытекает из следующего факта. Ген *tet* плазмиды pBR 325, имеющий последовательность ТТТАЦА и ТТТААТ в —35 и —10 участках промотора соответственно, транскрибируется в *B. subtilis* и, более того, придает клеткам высокий уровень устойчивости к тетрациклину [77]. Однако это наблюдение противоречит данным других авторов [37, 45] и требует дальнейшего подтверждения.

Одним из критических факторов в экспрессии гена может быть длина спейсера в промоторе. По крайней мере гибридный промотор *lac*, имеющий типичные —10 и —35 участки, не утилизирован полимеразой *B. subtilis*, возможно, из-за относительно короткой длины спейсера — всего 16 п. о. [102], а ген *cat* — из-за длинного спейсера — 20 п. о. [77]. Не исключено также, что кроме длины спейсера при гетерологичной экспрессии важен и его нуклеотидный состав и, в частности, наличие относительно консервативного участка от —17 до —14 позиции. Кстати, в гене *tet* плазмиды pBR 325, который может выражаться в *B. subtilis*, эта последовательность соответствует ТААГ, т. е. с одним отличием в —15 позиции от бактериальной последовательности ТПуГГ.

Важность присутствия других потенциально консервативных последовательностей в гетерологичном промоторе для его утилизации в клет-

ках *B. subtilis* пока неопределенна. Во всяком случае, блоки из олиго-(дА) и олиго-(дТ), предшествующие —35 участку бактериального промотора [104], отсутствуют как в энтеробактериальном гене *tet* плазмиды pBR 325 [77], так и в промоторах стафилококковых генов *cat* [61] и *erm* [49], которые эффективно экспрессируются в *B. subtilis*.

Ограниченная экспрессия гетерологичных генов бактерий в *B. subtilis* может быть обусловлена δ -фактором. Это предположение подтверждается только косвенными данными, исходя из которых добавление δ -фактора к холоферменту *B. subtilis* вызывает ингибирование транскрипции с матрицы ДНК фага Т7 [8] и плазмиды pBR 322 [30]. Однако нельзя исключить, что наблюдаемый эффект связан с прямой функцией δ -фактора—уменьшением неспецифического связывания РНК-полимеразы с ДНК, тем более что понижение транскрипционной активности при добавлении δ -фактора отмечается и на гомологичных матрицах ДНК.

Показано, что в системе анализа *Streptomyces* и *Enterobacteria* ситуация с утилизацией транскрипционных сигналов прямо противоположна описанной для *B. subtilis* и *E. coli* [14, 63]. Эффективность использования промоторов грамположительной мицелиальной бактерии *S. lividans* в клетках *E. coli* значительно ниже по сравнению с промоторами *B. subtilis* [14]. В то же время РНК-полимераза *S. lividans* узнает и эффективно инициирует синтез мРНК с транскрипционных сигналов не только грамположительной бактерии *B. licheniformis*, но и грамотрицательных бактерий *E. coli* и *S. marcescens*. Эти данные говорят скорее в пользу существования у прокариот родовой или видовой специфичности во взаимоотношениях гетерологичных промоторов с РНК-полимеразой, чем о существовании общих биологических факторов, ограничивающих экспрессию генов грамотрицательных бактерий в грамположительных микроорганизмах.

Трансляционные сигналы бактерий. Рибосома бактерий, состоящая из 30 S и 50 S субъединиц, функционально состоит из «трансляционного домена», который обеспечивает чтение мРНК и «выводящего домена», обуславливающего выход синтезированной цепи полипептида и связывание рибосомы с мембраной [82]. Структура рибосомы образована из трех видов рРНК и 52-х разных белков. Рибосомы неродственных бактерий по содержанию этих компонентов практически не отличаются, за исключением, возможно, белка S1, не входящего в состав рибосом грамположительных бактерий [58].

Нетранслируемые рРНК—5S (~110 п. о.), 16S (~1500 п. о.) и 23S (~2900 п. о.), входящие в состав рибосом, представлены в геноме прокариот в виде 16S—23S—5S транскрипционных единиц [107]. Между кодирующими 16S и 23S последовательностями *E. coli* имеется участок, кодирующий тРНК [75]. Такой участок не обнаружен у *B. thuringiensis* и, возможно, отсутствует у *B. subtilis* [73]. В хромосоме *E. coli* имеется 7 копий транскрипционных единиц рРНК, а в хромосоме *B. subtilis*—9 или 10 копий [93]. Конкретная роль рРНК в трансляции (за исключением 16S рРНК) пока неясна, однако высокий

уровень гомологии рРНК перодоственных бактерий предполагает их важность в детерминации какой-то определенной функции.

В инициации трансляции участвуют растворимые белки IF-1, IF-2 и IF-3, которые играют роль факторов, способствующих образованию комплекса с мРНК и иницирующей тРНК. Факторы инициации освобождаются от 30S субъединицы до или во время ее соединения с 50S субъединицей, и последующая элонгация полипептида осуществляется с участием других факторов [75].

В большинстве случаев инициация трансляции определяется кодоном АУГ. Но известны случаи, когда иницирующими кодонами являются также ГУГ, УУГ и АУУ [75]. АУГ кодону в полипептиде соответствует метионин, который в начале цепи поставляется формилированной метионин-тРНК. Возможно, формилирование является необходимым событием для узнавания тРНК фактором IF-2, так как он взаимодействует только с иницирующей тРНК с N-блокированной аминокислотой [136]. Метионин во внутреннюю часть синтезируемого полипептида поставляется другой — неформилированной метионин-тРНК. Иницирующие тРНК, которые гомологичны в пределах 81—97% своей последовательности [144], обладают структурными особенностями, которые отсутствуют у неиницирующих тРНК: наличие ГЦ пары в 4-х идентичных позициях [19], неспаренного нуклеотида на 5' конце и немодифицированного А на 3' конце антикодона, который может обеспечить ответ иницирующей тРНК не только на АУГ, но и другие триплеты [75].

Узнавание инициационных сайтов в мРНК является свойством самих рибосом [89]. В частности, отмывые от факторов инициации рибосомы все еще связываются с истинными сайтами инициации соответствующей мРНК [135], хотя следует иметь в виду, что фактор IF-3 может влиять на степень утилизации сайтов инициации, дифференциально стабилизируя связывание 30S субъединицы с мРНК.

В узнавании сайта инициации трансляции мРНК участвует только 30S субъединица [90]. Узнавание осуществляется непосредственно с помощью 16S рРНК и рибосомных белков [42, 57]. 16S рРНК «узнает» мРНК благодаря комплементарности своего 3' конца с определенным сайтом, названным сайтом Шайн-Дальгарно (или SD-сайтом), который предшествует иницирующему кодону трансляции [122, 134]. Анализ последовательностей более чем 150 бактериальных и фаговых мРНК указывает на присутствие этого сайта, который гомологичен ЦУЦЦ последовательности 16S рРНК *E. coli*, в пуринбогатой области из ~10 нуклеотидов [41]. Известно лишь несколько случаев отсутствия типичного SD-сайта и два случая, когда АУГ кодон столь близок к 5' концу мРНК, что нет места для SD-сайта. Роль SD-сайта в инициации трансляции доказана многими экспериментами [75].

Очевидно, на уровне трансляции экспрессия гена определяется не только степенью соответствия SD-сайта 3' концу хозяйской 16S рРНК, но и эффективностью связывания мРНК с рибосомой вообще. Какие же параметры могут влиять на эффективность этого связывания?

Во-первых, длина комплементарной последовательности SD-сайта с соответствующим участком 16S рРНК, которая в оптимальных случаях колеблется от 3 до 9 нуклеотидов. Нет доказательств того, что более протяженная комплементарная последовательность позволяет инициировать трансляцию с более высокой эффективностью. В то же время комплементарная последовательность всего из двух нуклеотидов не обеспечивает трансляцию [75]. Во-вторых, оптимальное расстояние между SD-сайтом и иницирующим кодоном (спейсерный участок) должно быть не менее 5 и не более 9 нуклеотидов. Если даже в спейсерном участке имеется потенциальный иницирующий кодон, инициация трансляции происходит с кодона, расположенного дальше — на оптимальном расстоянии от SD-сайта [23, 132]. В-третьих, вторичная структура мРНК может маскировать SD-сайт и иницирующий кодон таким образом, что затрудняется взаимодействие мРНК с рибосомой и соответственно ухудшается экспрессия гена [52, 65]. В-четвертых, вторичная структура самой 16S рРНК также может влиять на связывание с мРНК. Кроме того, гомология между определенными участками 5S и 16S рРНК предполагает, что их взаимодействие также важно при трансляции [11, 139]. По-видимому, 16S рРНК принимает альтернативные конфигурации в зависимости от ее участия в данный момент в инициации или элонгации трансляции. Однако следует отметить, что прямых доказательств функциональной значимости вторичной структуры рРНК и мРНК в экспрессии генов не имеется.

Есть косвенные сведения о том, что кроме SD-сайта в связывании с рибосомой участвуют и другие трансляционные сигналы мРНК. Например, в —1 позиции от первого нуклеотида иницирующего кодона чаще встречается пиримидин, а +4 позиции — пурип [75]. Кроме того, в бесклеточном экстракте в присутствии ингибитора элонгации спарсомицина рибосома связывается с мРНК и протектирует от действия нуклеаз участок длиной около 30 нуклеотидов, среднее расположение в котором имеют SD-сайт и иницирующий кодон [90]. Протектированный участок мРНК повторно плохо связывается с рибосомой, но при незначительном его удлинении эффективность связывания с ней восстанавливается [15].

Описаны также мутации, расположенные в спейсерном участке, до SD-сайта и сразу же после иницирующего кодона, которые снижают эффективность экспрессии генов [75]. Однако эти данные не исключают того, что нарушение связывания мутантной мРНК с рибосомой вызвано не изменением возможных дополнительных сигналов, а просто изменением вторичной структуры мРНК.

Факторы, ограничивающие трансляцию гетерологичных генов бактерий. Взаимозаменяемость компонентов аппарата трансляции у *Bacillus* и *Escherichia* говорит об их одинаковой структурной и функциональной организации [42, 57, 75]. Однако в противоположность рибосомам *E. coli*, которые эффективно транслируют мРНК грамположительных бактерий [10, 130], рибосомы представителей рода *Bacillus* неэффективны в трансляции мРНК грамотрицательных бактерий [44, 90, 129]. Это ограничение детерминировано 30S субъединицей [86].

Кроме того, трансляция мРНК грамположительной природы как в системе *B. subtilis*, так и *E. coli* меньше зависит от факторов инициации [97], чем трансляция мРНК грамотрицательной природы в *E. coli* [135]. Эти данные позволили предположить, что специфичность трансляции определяется особенностями структур мРНК грамположительных и грамотрицательных бактерий, ответственных за первичное связывание с рибосомой.

Секвенсный анализ показывает, что 3' конец 16S рРНК *E. coli* по сравнению с таковым в 16S рРНК грамположительных бактерий короче на 2 или 3 нуклеотида (табл. 2). Для SD-сайтов мРНК из грам-

Таблица 2

Последовательность 3' концов 16S рРНК прокариот

Источник	Последовательность	Ссылка
<i>E. coli</i>	...ААЩУГЩТУУГГАУЦАЩУЩУУА 3'	[122]
<i>B. stearothermophilus</i>	...ААГГУГЦГЦУГГАУЦАЩУЩУУУЦА	[128]
<i>B. subtilis</i>	...ААГГУГЦГГЦУГГАУЦАЩУЩУУУЦУ	цит. по [98]
<i>S. lividans</i> , <i>S. griseus</i>	...ААГГУГЦГГЦУГГАУЦАЩУЩУУУЦУ	цит. по [14]

положительных бактерий характерна более протяженная и менее вариабельная комплементарность с 3' концом 16S рРНК по сравнению с аналогичными сайтами *E. coli* [98, 102, 104]. Свободная энергия взаимодействия SD-сайта с 16S рРНК *B. subtilis* выше (Δ от -14 до -23 ккал/моль при среднем ΔG -17 ккал/моль), чем тот же параметр у *E. coli* (Δ от -4 до -22 ккал/моль при среднем ΔG -11,6 ккал/моль). Возможно, такая жесткость делает инициацию трансляции менее зависимой от факторов инициации и тем самым снижает эффективность связывания мРНК грамотрицательного источника с рибосомой *B. subtilis* [98]. В пользу такого предположения говорят также данные, согласно которым в мРНК грамотрицательной природы, трансляционные сигналы которых могут утилизироваться в *in vitro* и *in vivo* системе *B. subtilis*, SD-сайты имеют высокое значение ΔG [97, 128, 157]. Однако в случае использования в клетках *B. subtilis* трансляционных сигналов энтеробактериального гена *tel* жесткое соответствие SD-сайта 3' концу 16S рРНК может быть необязательным, если инициация трансляции осуществляется с участием той же короткой SD-последовательности АГГ, отстоящей на расстоянии 7 нуклеотидов от инициирующего кодона АТГ, как в клетках *E. coli* [146]. К сожалению, истинный SD-сайт гена *tel*, который используется в клетках *B. subtilis*, не определяется.

Важность стадии инициации трансляции для успешной экспрессии генов *E. coli* в клетках *B. subtilis* следует еще из двух фактов. У *B. subtilis* отсутствует белок S1, возможно, стабилизирующий взаимодействие мРНК с рибосомой у *E. coli* [142]. В образовании специфического инициаторного комплекса мРНК с рибосомой участвует белок S12, соответствующая функция которого отсутствует у *B. subtilis* [57].

Спейсерный участок между SD-сайтом и иницирующим кодоном у исследованных грамположительных бактерий колеблется от 6 до 17 нуклеотидов, составляя в среднем 7–8 нуклеотидов [98, 102], что сравнимо с его значением у *E. coli*. Каких-либо данных о роли этого спейсера в экспрессии гетерологичных генов не имеется.

Несмотря на скудность данных, замечено, что иницирующий УУГ кодон встречается у грамположительных бактерий чаще, чем у *E. coli* [91, 98]. В случае с геном β -лактамазы *S. aureus* иницирующему кодону УУГ соответствует иницирующая мет-тРНК [98].

Уместно также отметить, что у сильно- и слабоэкспрессируемых генов *E. coli* кодоны используются с различной частотой [18]. Следовательно, эффективность экспрессии чужеродного гена в новом хозяине будет зависеть и от частоты использования представленных в нем кодонов. В частности, в слабоэкспрессируемом в клетках *E. coli* гене дифтерийного токсина 36 из 39-ти кодонов лейцина являются редкими, 41% кодонов для изолейцина представлен в виде АТА по сравнению с встречаемостью этого кодона в генах *E. coli* в 1% случаев [69].

Таким образом, степень утилизации кодонов, определяемая ГЦ составом ДНК, может являться одним из общих факторов ограниченной экспрессии бактериальных генов в гетерологичных системах. Такой биологический барьер должен носить неспецифический характер, так как он будет зависеть от того, какие объекты использованы в конкретном случае для анализа гетерологичной экспрессии гена.

Биологический барьер экспрессии чужеродных генов на уровне трансляции может скорее носить родовой или видовой характер, чем отражать общее явление при гетерологичной экспрессии генов в системе грамположительных и грамотрицательных бактерий. Известно, что 3' конец 16S рРНК *S. lividans* полностью идентичен таковому *B. subtilis* (табл. 2). Тем не менее при отсутствии жесткой комплементарности SD-сайта мРНК *E. coli* с 3' концом 16S рРНК *S. lividans* в стрептомицинах эффективно утилизируются трансляционные сигналы грамотрицательных бактерий [119] и образуется функциональный полипептид [14]. В то же время ограниченная экспрессия генов стрептомицесов *E. coli* [14, 63] может быть связана с несоответствием их трансляционных сигналов с рибосомами *E. coli*.

Пути преодоления биологических барьеров экспрессии гетерологичных генов в бактериях. В генетике микроорганизмов метод слияния генов и оперонов с тест-регуляторным генетическим элементом и, наоборот, слияния не исследованных регуляторных элементов с тест-структурным геном применяется давно. Особенно удобен метод для достижения или усиления экспрессии клонированных генов в клетках про- и эукариот путем подстраивания структурной части гена под контроль гомологичных для хозяйской клетки транскрипционных и трансляционных сигналов. Этот подход независимо использован разными авторами и для достижения экспрессии генов энтеробактериальной природы в клетках *B. subtilis* путем подстройки регуляции гена под контроль либо гомологичных сигналов хромосомы *B. subtilis* и фара SP01 [43, 150], либо гетерологичных сигналов *B. thuringiensis* [4].

Использованный подход целесообразен в отношении бацилл по крайней мере по двум причинам. Во-первых, для упрощения изучения генетической регуляции. Для *B. subtilis* до недавнего времени не был известен механизм регуляции по принципу репрессор-операторного взаимодействия. Возможность существования такого механизма у бацилл показана в опытах по экспрессии *lac* репрессора *E. coli* и *B. subtilis* и его участия в контроле транскрипции с гибридных промоторов, содержащих *lac*-операторный участок *E. coli* [154]. Гибридная система, состоящая из структурной части гена *lacZ* *E. coli* и регуляторного участка гена *spoVG*, использовалась для изучения тонких сторон регуляции спорогенеза в *B. subtilis* [156]. Соединением структурной части гена β -лактамазы *E. coli* с промоторной и сигнальной последовательностями гена α -амилазы *B. subtilis* показана возможность секретиции функционального продукта грамотрицательной природы и *B. subtilis* [108]. Во-вторых, для получения биологически активных веществ. В клетках *B. subtilis* удалось уже осуществить экспрессию не только прокариотных, но и эукариотных генов [54, 150, 154].

Необходима ли для достижения экспрессии гетерологичного гена в бациллах его подстройка одновременно под контроль гомологичных транскрипционных и трансляционных сигналов? Представленные выше данные показывают, что некоторые гены грамотрицательных бактерий в клетках *B. subtilis* пуждаются только в транскрипционных сигналах гомологичной системы. Такая возможность показана даже для гена дигидрофлат редуктазы мыши [118]. Не исключается также, что гетерологичные гены, обладающие трансляционными и транскрипционными сигналами, соответствующими жестким требованиям трансляционного и транскрипционного аппаратов *B. subtilis*, будут функционально экспрессироваться в клетках бацилл.

Ограниченная экспрессия гетерологичных генов может носить родовой характер и в пределах грамотрицательных бактерий. В частности, гены *Pseudomonas* плохо экспрессируются в *E. coli* [24, 56, 131], тогда как гены *E. coli* экспрессируются в *Pseudomonas* на уровне исходного хозяина [59, 99]. Недавно появились сообщения о существовании семейства σ -факторов у *E. coli* и *S. coelicolor*. В случае с *E. coli* при тепловом шоке клеток появляется новый σ -фактор с мол. весом 32000—продукт гена *htrR* (или *groH*), который узнает ряд промоторов, не функционирующих в присутствии основного σ -фактора. Новый σ^{32} может транскрибировать ген *groD* с промотора, не узнаваемого основным σ -фактором. Минорные σ^{32} и σ^{26} факторы *E. coli* и *B. subtilis* соответственно могут проявлять перекрывающуюся промоторную специфичность. Таким образом, гетерогенность РНК-полимераз у бактерий является более распространенным явлением, чем предполагалось, и наличие в бактериальной клетке σ -факторов с различной промоторной специфичностью может играть более существенную роль в реализации чувствительной генетической информации.

Появились также данные о новых факторах, влияющих на экспрессию гетерологичных бактериальных генов. В частности, ограничение экспрессии гена *hisG* *E. coli* в *B. subtilis* связано с преждевременной

терминацией транскрипции—суператтенуацией. Кроме того, у спонтанных мутантов *B. subtilis* с повышенной экспрессией энтеробактериального гена *cat*, предварительно подстроенного под контроль бактериального промотора, в районе расположения SD-сайта и иницирующего кодона обнаружены дубликации и трипликации. Предполагается, что в *B. subtilis* для эффективной экспрессии чужеродного гена важна не столько позиция SD-сайта, сколько присутствие и размер вторичных структур мРНК внутри трансляционных сигналов.

Вопрос о том, насколько уникальны описанные здесь факторы, играющие роль биологических барьеров гетерологичной экспрессии бактериальных генов в грамотрицательных и грамположительных прокариотах, требует еще своего решения. Во всяком случае, недавно показано, что гены *E. coli* экспрессируются еще в двух грамположительных микроорганизмах— *Brevibacterium* и *Corynebacterium*.

Научно-исследовательский технологический
институт аминокислот, Ереван

Поступило 9.1.1985 г.

ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ԳԵՆՆԵՐԻ ՀԵՏԵՐՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՆ ՊՐՈԿԱՐԻՈՏՆԵՐՈՒՄ

Վ. Ա. ՍԱԿԱՆՅԱՆ

Հետադրուված են այն ֆակտորները, որոնք խոչընդոտում են բակտերիաների հետերոլոգիական գեների արտահայտումը պրոկարիոտ սխեմաներում արանսկրիպցիոն և արանսլայցիոն ստադիաներում: Հատուկ ուշադրություն է դարձված տարբեր բակտերիաների տրանսկրիպցիոն և արանսլայցիոն ազդեցանքների համեմատական էությունը: Քննարկված են նաև կենսաբանական խոչընդոտների հաղթահարման ուղիները՝ հետերոլոգիական գեների արտահայտմանը հասնելու համար:

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF BACTERIAL GENES IN PROCARYOTES

V. A. SAKANYAN

The transcriptional and translational factors which can prevent the expression of heterologous bacterial genes in procaryotes have been discussed. From this point of view the transcriptional and translational signals of unrelated bacteria are compared. There are also discussed the ways of overcoming the biological barriers to achieve the expression of heterologous genes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Данилевская О. Н. Мол. биол., 16, 453—480, 1982.
2. Лидеман Л. Ф. Генетика, 19, 693—707, 1983.
3. Никифоров В. Г. Докт. дисс., М., 1984.
4. Саханян В. А., Цой Т. В., Сезонов Г. В., Алиханян С. Н. Генетика, 18, 1825—1834, 1982.
5. Цой Т. В., Сорокин А. В., Крупенко М. А., Сезонов Г. В., Ребенитш Б. А., Саханян В. А., Алиханян С. Н. Генетика, 20, 1419—1427, 1984.

6. Ченчик А. А., Библианивили Р. Ш., Мурзабеков А. Д. Докл. АН СССР, 260, 765—769, 1981.
7. Achberger E. C., Whiteley H. R. J. Biol. Chem., 255, 11957—11964, 1980.
8. Achberger E. C., Whiteley H. R. J. Biol. Chem., 256, 7424—7432, 1981.
9. Aoyama T., Takanami M., Ohisuka E., Taniyama Y., Marumoto R., Sato H., Ishihara M. Nucl. Acids Res., 11, 5855—5864, 1983.
10. Arnaud M., Mahler I., Halvorson H. O., Boschwitz H., Keynan A. J. Bacteriol., 142, 1045—1049, 1980.
11. Azad A. A. Nucl. Acids Res., 7, 1913—1929, 1979.
12. Banner C. D. R., Moran C. P., Losick R. J. Mol. Biol., 163, 351—370, 1983.
13. Beveridge T. J. Int. Rev. Cytol., 72, 229—317, 1981.
14. Bibb M. J., Cohen S. N. Mol. Gen. Genet., 187, 265—277, 1982.
15. Borisova G. P., Volkova T., Berzin V., Rosenthal G., Grezn E. Nucl. Acids Res., 6, 1761—1774, 1979.
16. Brammar W. J., Muir S., McMorris A. Mol. Gen. Genet., 179, 217—221, 1980.
17. Brennan S. M., Geldushek E. P. Nucl. Acids Res., 11, 4157—4175, 1983.
18. Bujard H., Niemann A., Breunig K., Roisch U., Dresel A., von Gabain A., Gentz R., Stuber D., Welther H. In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press, New York, 121—140, 1982.
19. Calagan J. L., Pittle R., Pittle L., Kashdan M., Vreman H., Dudoek B. J. Biol. Chem., 255, 9991—9994, 1980.
20. Cantwell B. A., McConnell D. J. Gene, 23, 211—219, 1983.
21. Chamberlin M. J. Annu. Rev. Biochem., 43, 721—775, 1974.
22. Chilm B. K., Duffy J. J., Geldushek E. P. J. Biol. Chem., 257, 6501—6508, 1982.
23. Christie G. E., Platt T. J. Mol. Biol., 142, 519—530, 1980.
24. Clarke P. H., Laverack P. D. J. Bacteriol., 154, 508—512, 1983.
25. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. V., Helling R. B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3240—3244, 1973.
26. Costanzo M., Pero J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1236—1240, 1983.
27. Davison B. L., Leighton T., Rabinowitz J. C. J. Biol. Chem., 254, 9220—9226, 1979.
28. Davison B. L., Murray C. L., Rabinowitz J. C. J. Biol. Chem., 255, 8819—8830, 1980.
29. De Boer H. A., Comstock L. J., Vasser M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21—25, 1983.
30. Dol R. H. Arch. Biochem. Biophys., 214, 772—781, 1982.
31. Duffy J. J., Geldushek E. P. J. Biol. Chem., 250, 4530—4541, 1975.
32. Duffy J. J., Geldushek E. P. Nature, 270, 28—32, 1977.
33. Ehrlich S. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1433—1436, 1978.
34. Ehrlich S. D., Sgarbetta V. Trends Biochem. Sci., 3, 259—261, 1978.
35. Ehrlich S. D., Bursztyn-Pettegrew H., Stroynowski L., Lederberg J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4145—4149, 1976.
36. Ernst H., Hartmann G. R., Dombey H. J. Biol. Chem., 154, 427—433, 1982.
37. Ferrari F. A., Nguyen A., Long D., Hoch J. A. J. Bacteriol., 154, 1513—1515, 1983.
38. Fox T. D., Losick R., Pero J. J. Mol. Biol., 101, 427—433, 1976.
39. Fukuda R., Dol R. H. J. Bacteriol., 129, 422—432, 1977.
40. Gilman M. Z., Wiggs J. L., Chamberlin M. J. In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press, New York, 293—304, 1982.
41. Gold L., Friebow D., Schneider T., Shinedling S., Singer B. S., Stormo G. Annu. Rev. Microbiol., 35, 365—403, 1981.
42. Goldberg M. L., Steltz J. A. Biochem., 13, 2123—2129, 1974.
43. Goldfarb D. S., Dol R. H., Rodriguez R. L. Nature, 293, 309—311, 1981.
44. Goldfarb D. S., Rodriguez R. L., Dol R. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5886—5890, 1982.
45. Goldfarb D. S., Dol R. H., Close T. J., Rodriguez R. L. In: Molecular cloning and gene regulation in Bacilli. Ganesan A. T., Chang S., Hoch J. A. (eds), Academic Press, New York, 311—324, 1982.

46. Goze A., Ehrlich S. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7333—7337, 1980.
47. Grandi G., Mottes M., Sgaramella V. *Plasmid*, 6, 99—111, 1981.
48. Grosjean H., Fiers W. *Gene*, 18, 199—209, 1982.
49. Gryczan T., Grandi G., Hahn J., Grandi R., Dubnau D. *Nucl. Acids Res.*, 8, 6081—6096, 1980.
50. Haldenwang W. C., Losick R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7000—7004, 1980.
51. Haldenwang W. G., Lang N., Losick R. *Cell*, 23, 615—624, 1981.
52. Hall M. N., Gabay J., Darbhouille M., Schwartz M. *Nature*, 295, 616—618, 1982.
53. Hardy K., Haefell C. J. *Bacteriol.*, 152, 524—526, 1982.
54. Hardy K., Stahl S., Kupper H. *Nature*, 293, 481—483, 1981.
55. Hawley D. K., McClure W. R. *Nucl. Acids Res.*, 11, 2237—2255, 1983.
56. Hedges R. W., Jacob A. E., Crawford J. P. *Nature*, 267, 283—284, 1977.
57. Held W. A., Geste W. R., Nomura M. *Biochem.*, 13, 2115—2122, 1974.
58. Hlgo K., Otake E., Osawa S. *Mol. Gen. Genet.*, 185, 239—244, 1982.
59. Holloway B. W., Krishnapillai V., Morgan A. F. *Microbiol. Rev.*, 43, 73—102, 1979.
60. Holmes W. M., Platt T., Rosenberg M. *Cell*, 32, 1029—1032, 1983.
61. Horinouchi S., Wetsblum B. J. *Bacteriol.*, 150, 815—825, 1982.
62. Horinouchi S., Byeon W.-H., Wetsblum B. J. *Bacteriol.*, 154, 1252—1262, 1983.
63. Horinouchi S., Uozumi T., Beppu T. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 367—381, 1980.
64. Huang J.-Y., Dot R. H. *J. Biochem.*, 104, 313—320, 1980.
65. Iserentant D., Fiers W. *Gene*, 9, 1—12, 1980.
66. Ishihama A. *Adv. Biophys.*, 14, 1—35, 1981.
67. Jahnig J. A., Wiggs J. L., Chamberlin M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5470—5474, 1979.
68. Johnson W. C., Moran C. P., Losick R. *Nature*, 302, 800—804, 1983.
69. Kaczorek M., Delpyroux F., Chenciner N., Streek R. E., Murphy J. R., Boquet P., Tiollais P. *Science*, 221, 855—858, 1983.
70. Kajitani M., Ishihama A. *Nucl. Acids Res.*, 11, 3873—3885, 1983.
71. Klier A., Fargette F., Ribier J., Rapoport G. *EMBO J.*, 1, 791—799, 1982.
72. Klier A. F., Lecadet M.-M., Dedonder R. *Europ. J. Biochem.*, 35, 317—327, 1973.
73. Klier A. F., Kunst F., Rapoport G. *Nucl. Acids Res.*, 7, 997—1010, 1979.
74. Klier A. F., Parsot C., Rapoport G. *Nucl. Acids Res.*, 11, 3973—3987, 1983.
75. Kozak M. *Microb. Rev.*, 47, 1—45, 1983.
76. Kreft J., Bernhard K., Goebel W. *Mol. Gen. Genet.*, 162, 59—67, 1978.
77. Kreft J., Burger K. J., Goebel W. *Mol. Gen. Genet.*, 192, 384—389, 1983.
78. Kroyer J., Chang S. *Gene*, 15, 343—347, 1981.
79. Kudo T., Dot R. H. *J. Biol. Chem.*, 256, 9775—9781, 1981.
80. Kudo T., Jaffe D., Dot R. H. *Mol. Gen. Genet.*, 181, 63—68, 1981.
81. Lai J.-S., Sarcus M., Brammar W. J., Neugebauer K., Wu H. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3506—3510, 1981.
82. Lake J. A. *Cell*, 33, 318—319, 1983.
83. Lawrie J. M., Spiegelman G. B., Whitteley H. R. *Gene*, 2, 251—262, 1977.
84. Lee G., Pero J. J. *Mol. Biol.*, 152, 247—265, 1981.
85. Lee G., Talkington C., Pero J. *Mol. Gen. Genet.*, 180, 57—65, 1980.
86. Legault-Demare L., Chambliss G. H. *Mol. Gen. Genet.*, 142, 277—287, 1975.
87. Leong D., Coleman K. D., Murphy J. R. *Science*, 220, 515—517, 1983.
88. Leong D., Coleman K. D., Murphy J. R. *J. Biol. Chem.*, 258, 15016—15020, 1983.
89. Lodish H. F. *Nature*, 224, 867—870, 1969.
90. Lodish H. F. *Nature*, 226, 705—707, 1970.
91. Lofdahl S., Guss B., Uhlen M., Philipson L., Lindberg M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 697—701, 1983.
92. Losick R., Pero J. *Cell*, 25, 582—584, 1981.
93. Loughney K., Lund E., Dahlberg J. E. *Nucl. Acids Res.*, 10, 1607—1624, 1982.
94. Matke H., Holm S. E. *Mol. Gen. Genet.*, 181, 283—295, 1981.
95. Mahler I., Halvorson H. O. *J. Bacteriol.*, 131, 374—377, 1977.
96. Mazza G., Perego M., Riva S. *Mol. Gen. Genet.*, 185, 397—403, 1982.

97. McLaughlin J. R., Murray C. L., Rabinowitz J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4912-4916, 1981.
98. McLaughlin J. R., Murray C. L., Rabinowitz J. C. *J. Biol. Chem.*, 256, 11283-11291, 1981.
99. Mergeay M., Boyen A., Legrain C., Glansdorff N. J. *Bacteriol.*, 136, 1187-1188, 1978.
100. Moran C. P., Lang N., Losick R. *Nucl. Acids Res.*, 9, 5979-5989, 1981.
101. Moran C. P., Lang N., Banner C. D. B., Haldenwang W. G., Losick R. *Cell*, 25, 783-791, 1981.
102. Moran C. P., Lang N., LeGrice S. F., Lee G., Stephens M., Sonenshein A. L., Pero J., Losick R. *Mol. Gen. Genet.*, 186, 339-346, 1982.
103. Murphy N., McConnell D. J., Cantwell B. A. *Nucl. Acids Res.*, 12, 5355-5367, 1984.
104. Murray C. L., Rabinowitz J. C. *J. Biol. Chem.*, 257, 1033-1062, 1982.
105. Nagahart K., Sakaguchi K. *Mol. Gen. Genet.*, 158, 263-270, 1978.
106. Nomura T., Ishihama A., Kajitani M., Takahashi T., Nakada N., Yoshinaga K. *Mol. Gen. Genet.*, 193, 8-16, 1984.
107. Nomura M., Morgan E., Juskunas S. R. *Annu. Rev. Genetics*, 11, 29-347, 1977.
108. Ohmura K., Nakamura K., Yamazaki H., Shiroza T., Yamane K., Jigami Y., Tanaka H., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G. *Nucl. Acids Res.*, 12, 5307-5319, 1984.
109. Oppenheim D. S., Bennett G. N., Yanofsky C. J. *Mol. Biol.*, 114, 143-147, 1983.
110. Park C. S., Hillel Z., Wu C.-W. *J. Biol. Chem.*, 257, 6944-6949, 1982.
111. Pero J., Nelson J., Fox T. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1789-1793, 1975.
112. Ptibnow D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 784-789, 1975.
113. Rosenberg M., Court D. *Ann. Rev. Genetics*, 13, 319-353, 1979.
114. Russel D. R., Bennett G. N. *Gene*, 20, 231-243, 1982.
115. Schaller H., Gray C., Hermann K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 737-741, 1975.
116. Scherer G. E. F., Watkinson M. D., Arnott S. *Nucl. Acids Res.*, 5, 3759-3773, 1978.
117. Schmitt A., Galas D. *Nucl. Acids Res.*, 6, 111-137, 1979.
118. Schoner R. G., Williams D. M., Lovett P. S. *Gene*, 22, 47-57, 1981.
119. Schottel J. L., Bibb M. J., Cohen S. N. *J. Bacteriol.*, 146, 360-368, 1981.
120. Shigesada K., Imai M. *Biochem.*, 21, 5849-5856, 1982.
121. Shimotsu H., Kawamura F., Kobayashi Y., Saito H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 658-662, 1983.
122. Shine J., Dalgarno L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1342-1346, 1974.
123. Shorestein R. G., Losick R. *J. Biol. Chem.*, 248, 6170-6173, 1973.
124. Siebentist U., Simpson R. B., Gilbert W. *Cell*, 20, 259-281, 1980.
125. Simpson R. B. *Cell*, 18, 277-285, 1979.
126. Sogin M. L., Pace N. R., Rosenberg M., Weissman S. M. *J. Biol. Chem.*, 251, 3480-3488, 1976.
127. Spiegelman G. B., Hall W. R., Whiteley H. P. *J. Biol. Chem.*, 253, 1756-1765, 1978.
128. Sprague K., Steltz J., Grenley R., Stocking C. *Nature*, 267, 462-465, 1977.
129. Stallcup M. R., Rabinowitz J. C. *J. Biol. Chem.*, 248, 3209-3219, 1973.
130. Stallcup M. R., Sharrock W. J., Rabinowitz J. C. *J. Biol. Chem.*, 251, 2499-2510, 1976.
131. Stapleton M. J., Jagger K. S., Warren R. L. *J. Bacteriol.*, 157, 7-12, 1984.
132. Steege D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4163-4167, 1977.
133. Stefano J. E., Ackerson J. W., Gralla J. D. *Nucl. Acids Res.*, 8, 2709-2723, 1980.
134. Steltz J. A., Jakes K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 4734-4738, 1975.
135. Steltz J. A., Wahba A. J., Laughrea M., Moore P. B. *Nucl. Acids Res.*, 4, 1-15, 1977.
136. Sundan R. M., Stringer E. A., Schulman L. H., Mitta U. *J. Biol. Chem.*, 251, 3338-3345, 1976.

137. Talkington C., Pero J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1165—1189, 1978.
138. Talkington C., Pero J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5465—5469, 1979.
139. Thompson J. F., Hearst J. E. Cell, 33, 19—24, 1983.
140. Travers A. A., Lamond A. I., Mace H. A. F. In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press, New York, 216—228, 1982.
141. Tæeten R. K., Collier R. J. J. Bacteriol., 136, 680—685, 1983.
142. Van Dieijen G., Zipori F., Van Prooijen W., Van Duin J. J. Biochem., 90, 571—576, 1978.
143. Von Hippel R. H., Bear D. G., Winter R. B., Berg O. G. In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press, New York, 3—33, 1982.
144. Walker R. T., RajBhandary U. L. Nucl. Acids Res., 5, 57—70, 1978.
145. Weiher H., Schaller H. Proc. Natl. Sci. USA, 79, 1408—1412, 1982.
146. West R. W., Rodriguez R. L. Gene, 20, 291—304, 1982.
147. Wiggs J. L., Bush J. W., Chamberlin M. Cell, 16, 97—109, 1979.
148. Wiggs J. L., Gilman M. Z., Chamberlin M. Proc. Natl. Acad. USA, 78, 2762—2766, 1981.
149. Whiteley H. R., Achberger E. C., Hilton M. D. In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press, New York, 267—282, 1982.
150. Williams D. M., Schoner R. G., Duvall E. J., Preis L. H., Lovett P. S. Gene, 16, 199—206, 1981.
151. Williamson V. M., Dol R. H. Mol. Gen. Genet., 161, 135—141, 1978.
152. Wong S.-L., Dol R. H. J. Biol. Chem., 257, 11932—11936, 1982.
153. Wong S.-L., Dol R. H. J. Biol. Chem., 259, 9762—9767, 1984.
154. Yansura D. G., Henner D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 439—443, 1984.
155. Zimmer S. G., Millette R. L. J. Biol. Chem., 254, 2199—2204, 1979.
156. Zuber P., Losick R. Cell, 35, 275—283, 1983.
157. Zukowski M. M., Gaffney D. F., Speck D., Kauffman M., Findell A., Watscup A., Lecocq J.-P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1101—1105, 1983.

«Биолог. ж. Армения», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 579.25.873

ГЕНЕТИКА АКТИНОФАГОВ И ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С АКТИНОМИЦЕТАМИ

И. Д. ЛОМОВСКАЯ, И. М. МКРТУМЯН, Т. А. ВОЕНКОВА,
Г. Л. МУРАВНИК, Е. В. ПЕРОВА

Представлен обзор по генетике актинофагов и некоторым вопросам, связанным с их взаимодействием с хозяевами *Streptomyces*. Данные по генетическому и физическому картированию умеренного фага ØC31 создали основу для использования делеционных мутантов фага при конструировании векторов. Генетические и физические исследования родственного фага ØC43 показали присутствие в его геноме IS-подобной структуры, которая генерирует делеции с высокой частотой. Продемонстрирована возможность селекции *in vivo* фагов со структурными модификациями ДНК ØC43.

Суммированы генетические данные по системам рестрикции и модификации, а также распространенности этих систем среди видов *Streptomyces*. Подчеркнута роль генетических данных актинофагов для фундаментальных и прикладных исследований актиномицетов.

Ключевые слова: генная инженерия, актинофаг, генетическая карта, модификация и рестрикция ДНК, векторы.