

© Л. К. Савинкова, А. А. Соколенко, В. Л. Кнорре,  
Р. И. Салганик, А. Г. Веняминава, М. Н. Репкова, 1990

## ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДЫ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЕМЫЕ ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗой ESCHERICHIA COLI, НЕ ЯВЛЯЮТСЯ АНАЛОГАМИ ПРОМОТОРНЫХ УЧАСТКОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С ФЕРМЕНТОМ

*В работе проверено выдвинутое ранее авторами предположение о том, что специфически связываемые РНК-полимеразами прокариот олигорибонуклеотиды гомологичны узнаваемым этими ферментами участкам промоторов. Показано, что олигорибонуклеотиды, гомологичные «—10» области промотора (нетранскрибируемой нити), не связываются РНК-полимеразой *E. coli* и являются, возможно, аналогами каких-то других регуляторных участков*

**Введение.** Проведенные ранее [1—4] исследования показали, что РНК-полимеразы *E. coli* и фагов Т3 и Т7 способны с высокой избирательностью связывать олигорибонуклеотиды длиной от 5 до 8 мономеров, которые они выбирают из статистических изоплитных смесей эндонуклеазных гидролизатов РНК-транскриптов, считанных симметрично с обеих нитей бактериальных или фаговых ДНК. Такие избирательно связываемые олигорибонуклеотиды при добавлении в систему транскрипции подавляют ДНК-зависимый синтез РНК, катализируемый соответствующей бактериальной или фаговой РНК-полимеразой, не влияя на синтез РНК, катализируемый другими, не взаимодействующими с ними, РНК-полимеразами. Мы предположили, что РНК-полимеразы *E. coli*, фагов Т3 и Т7 связывают олигорибонуклеотиды, гомологичные участкам промоторов, которые взаимодействуют с этими РНК-полимеразами. При этом нельзя было исключить того, что РНК-полимеразы узнают и связывают какие-то иные, не относящиеся к промоторам, олигорибонуклеотидные последовательности.

Для проверки этого предположения нами были синтезированы олигорибонуклеотиды, гомологичные «—10» области промотора *spc*-генов *E. coli*, кодирующих рибосомные РНК, и исследовано взаимодействие с ними РНК-полимеразы *E. coli*.

**Материалы и методы.** В работе использовали РНК-полимеразу *E. coli* с удельной активностью 2000 ед. акт/мл, производство НПО «Вектор», трис-НСI и β-меркаптоэтанол («Serva», ФРГ), рибонуклеозиды и диметокситритилхлорид, производство НПО «Биолар» (Олайн, ЛатвССР), 1,3-дихлоро-1,1,3,3-тетраизопротилдисилоксан («Sigma», США), пивалоилхлорид, дихлоруксусную кислоту («Fluka», Швейцария). N-ацил-5'-O-диметокситритил-2'-O-тетрагидропирионилрибонуклеозиды получали по [5].

Синтез и выделение N-ацил-5'-O-диметокситритил-2'-O-тетрагидропирионилрибонуклеозид-3-Н-фосфонатов проводили по методу, описанному нами ранее [6].

Для автоматического синтеза олигорибонуклеотидов Н-фосфонатным методом использовали синтезатор «Виктория-5» (СКТБ спецэлектроники и аналитического приборостроения Сиб. отд-ния АН СССР). В качестве полимерного носителя применяли стекло СРГ-500 (120—200 меш) («Fluka»). Модификацию полимера и присоединение первого нуклеозидного звена осуществляли по [7, 8]. Количество введенного в полимер нуклеозиды составляло около 30 мкмоль/г. Для синтеза использовали 15 мл полимера.

Синтез вели по аналогии со схемой, описанной нами ранее [9], за исключением того, что в данном случае 0,04 М раствор нуклеозид-Н-фосфоната и 0,2 М раствор пивалоилхлорида подавали в реактор порциями (3 раза по 60 мкл каждого). Время конденсации 90 с, общее время цикла, включая промывку соответствующими растворителями, 6 мин. После синтеза полимер обрабатывали свежеприготовленным 0,2 М раствором йода в смеси пиридин—вода (98:2) в течение 30 мин, затем полимер промывали ацетоном и высушивали.

Олигонуклеотиды после удаления их с полимера и гидролиза защитных групп стандартными методами выделяли методом высокоэффективной жидкостной хромато-

графин («Altex», США), используя для ионообменной хроматографии колонку (4,6×259 мм) с Полисил-СА [10] и градиент концентрации  $K_2HPO_4$  (0—0,3 М в 30 % MeCN), скорость элюции 3 мл/мин.

Для обращеннофазовой хроматографии использовали колонку (4,6×250 мм) с Lichrosorb RP-18 («Merck», ФРГ) и градиент концентрации ацетонитрила (0—20 %) в 0,05 М растворе перхлората лития, скорость элюции 2 мл/мин. Олигорибонуклеотиды выделяли в виде литиевых солей осаждением из водного раствора в 2 %-ный раствор перхлората лития в ацетоне.

Нуклеотидный состав синтезированных олигонуклеотидов подтверждали путем гидролиза смесью ФДЭ (КФ 3.1.4.1) и 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) из яда кобры (Новосиб. гос. ун-т) с последующим количественным анализом данных. Микроколоночную хроматографию проводили на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром» (ПО «Научприбор», г. Орел). Для разделения использовали колонку (2×62 мм) с сорбентом Nucleosil C-18, 5 мкм («Macherey-Nagel», ФРГ) и градиент концентрации метанола (0—80 %) в 0,02 М трис-ацетате, pH 5,0 со скоростью потока 100 мкл/мин.

Введение  $^{32}P$  метки по 5'-концу олигорибонуклеотидов проводили с помощью  $^{32}P$ -АТФ (удельная активность 37 ТБк/ммоль, «Радиопрепарат», Ташкент) и Т4-поли-нуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78) (НПО «Фермент», Вильнюс), как описано в [11]. Первичную структуру меченых олигорибонуклеотидов (анализы проведены М. Зенковой) определяли по методу Донис—Келлер [11] с использованием T1 (КФ 3.1.27.3) и U2 (КФ 3.1.27.4) РНКаз («Pharmacia», Швеция) и РНКазы А (КФ 3.1.27.5) («Miles», Англия).

Образование комплексов олигорибонуклеотидов с РНК-полимеразой *E. coli* проводили в ранее описанных условиях [12].

**Результаты и обсуждение.** Ранее при исследовании взаимодействия РНК-полимераз *E. coli* фагов Т3 и Т7 с олигорибонуклеотидами мы показали, что эти РНК-полимеразы избирательно связывают определенные фракции статистических изоэлитных наборов олигорибонуклеотидов с числом мономеров  $>5$ , составляющие 0,3—0,9 % от каждой изоэлитной фракции.

В настоящей работе мы исследовали влияние таких олигорибонуклеотидов, специфически связываемых РНК-полимеразами, на транскрипцию ДНК, катализируемую этими ферментами. Как видно из рис. 1, олигорибонуклеотиды, избирательно связываемые РНК-полимеразой *E. coli*, при добавлении их в систему транскрипции *in vitro* (до введения ДНК) ингибируют ДНК-зависимый синтез РНК, катализируемый этим ферментом (рис. 1, а), не оказывая влияния на синтез РНК, катализируемый фаговыми РНК-полимеразами. Аналогичное влияние на синтез РНК, катализируемый РНК-полимеразами фагов Т3 и Т7, оказывают пентарибонуклеотиды, узнаваемые и избирательно связываемые РНК-полимеразами фагов Т3 и Т7 (рис. 1, б и в). Три- и тетрарибонуклеотиды, которые не связываются избирательно этими РНК-полимеразами, не тормозят ДНК-зависимый синтез РНК, катализируемый этими ферментами (рис. 1, 2).

Следует отметить, что олигорибонуклеотиды, избирательно связываемые РНК-полимеразами, содержатся только в эндонуклеазных гидролизатах симметрично транскрибированных РНК [3]. Как известно, при симметричной транскрипции неспецифически считываются обе нити ДНК [13—15], и РНК-транскрипты представляют собой также и рибонуклеотидные гомологи промоторов и других регуляторных участков. При асимметричной (специфической) транскрипции считывается только значащая нить ДНК, и полученные транскрипты не содержат регуляторных последовательностей. В составе олигорибонуклеотидов, полученных гидролизом РНК, синтезированной в результате специфической асимметричной транскрипции, не содержалось аффинных олигорибонуклеотидов, связываемых РНК-полимеразой [3].

Эти данные позволили предположить, что специфически связываемые РНК-полимеразами олигорибонуклеотиды гомологичны узнаваемым этими ферментами участкам промоторов. Попытки расшифровать нуклеотидные последовательности таких олигорибонуклеотидов не увен-

чались успехом из-за большой гетерогенности связываемой РНК-полимеразы фракции.

Поскольку ранее установлено, что такими участками промоторов являются олигорибонуклеотидные последовательности «-10»-района промоторов с фланкирующими нуклеотидами, относящиеся к нетранскрибируемой нити ДНК [15], то представлялось вероятным, что олигорибонуклеотиды, избирательно связываемые РНК-полимеразой, также относятся к этим участкам промоторов.

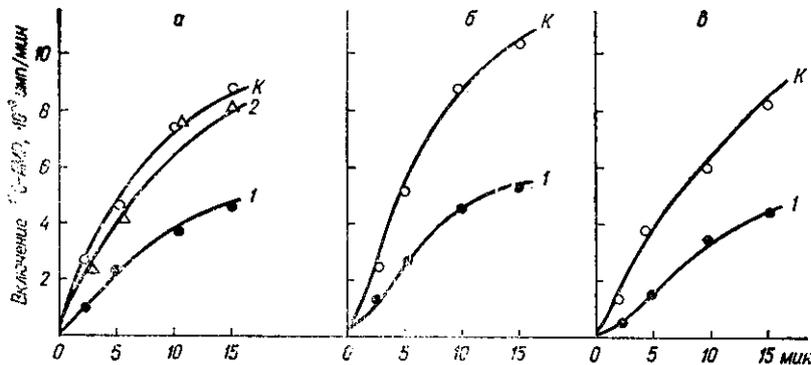


Рис. 1. Влияние специфически связываемых олигорибонуклеотидов на ДНК-зависимый синтез РНК, катализируемый РНК-полимеразой *E. coli*, фагов Т7, Т3: К (контроль) — синтез РНК, катализируемый РНК-полимеразой *E. coli* (а), фага Т7 (б), фага Т3 (в); кривая 1 — синтез РНК, катализируемый РНК-полимеразой *E. coli*, Т7, Т3 при добавлении изоплитной смеси октарибонуклеотидов, специфически связываемых РНК-полимеразой *E. coli* (а), Т7 (б), Т3 (в), в концентрации 40 нмоль/мл; кривая 2 — синтез РНК, катализируемый РНК-полимеразой *E. coli* при добавлении в систему транскрипции изоплитной смеси тетрарибонуклеотидов, в концентрации 40 нмоль/мл. Инкубационная смесь содержала: 0,05 М трис-НСl, рН 7,9, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 8 мМ MgCl<sub>2</sub>. Концентрация РНК-полимеразы *E. coli* — 0,5 нмоль/мл, Т7 и Т3 — 5 нмоль/мл, ДНК фагов Т7 и Т3 — 30 мкг/мл, АТФ, ГТФ, СТФ, УТФ — 0,4 мМ каждый, 1 110 Бк <sup>14</sup>С-ГТФ. После преникубации фермента с октарибонуклеотидами (5 мин при комнатной температуре) синтез РНК инициировали добавлением матрицы (ДНК Т7 для РНК-полимеразы *E. coli* и фага Т7 и ДНК Т3 для РНК-полимеразы фага Т3) и реакцию продолжали при 37 °С. Затем ее останавливали добавлением холодной 5 %-ной ТХУ. Осадок собирали на фильтры GF/C и определяли радиоактивность.

Fig. 1. Effect of specifically bound oligoribonucleotides on DNA-dependent RNA-synthesis by *E. coli*, T7 and T3 phages RNA polymerases: K (control)—RNA-synthesis without oligoribonucleotides. Incubation mixture contained 0.05 M tris-HCl (pH 7.9), 10 mM β-mercaptoethanol, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM concentrations each of ATP, UTP, CTP, GTP, 0.03 μCi [<sup>14</sup>C]GTP, 0.5 μM *E. coli* RNA polymerase (a); 5 μM T7 (б) and T3 (в) RNA polymerases, 30 μg/ml of T7 and T3 DNA and 40 μM octaribonucleotides. RNA polymerase (*E. coli*, T7 and T3) was preincubated with octaribonucleotides for 5 min. at room temperature (curve 2 — *E. coli* RNA polymerase was preincubated with tetra-ribonucleotides), then DNA was added and RNA synthesis was carried out at 37 °C. The reaction was terminated by addition of cold 5 % trichloroacetic acid. Precipitates were collected on GF/C filters and radioactivity was determined.

Для проверки этого предположения мы синтезировали серию олигорибонуклеотидов, гомологичных олигодезоксирибонуклеотидным последовательностям «-10»- и «-35»-областей промотора рибосомных генов *E. coli*. Последовательности олигорибонуклеотидов, синтезированных автоматическим Н-фосфонатным методом, представлены в таблице. Данные по определению нуклеотидного состава полученных олигорибонуклеотидов в сочетании с результатами исчерпывающего гидролиза их соответствующими рибонуклеазами свидетельствуют о том, что в синтезированных олигорибонуклеотидах отсутствуют сколько-нибудь заметные примеси олигонуклеотидов с модифицированными основаниями или изомеризованными связями.

Приведенный в таблице додекануклеотид гомологичен олигодезоксирибонуклеотиду, который относится к «-10»-области промотора *src*-генов *E. coli* (от +1 до -12 нуклеотидов) и с высокой эффективностью узнается и связывается РНК-полимеразой *E. coli* [16]. Мы исследовали

также связывание РНК-полимеразой октарибонуклеотидов, относящихся к «-10»- и «-35»-районам промотора *src*-генов, поскольку с наибольшей эффективностью РНК-полимераза *E. coli* связывает олигорибонуклеотиды длиной в 8 мономеров.

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, РНК-полимераза *E. coli* с высокой эффективностью связывает 12-мерный олигодезоксирибонуклеотид, относящийся к «-10»-области промотора рибосомных генов *E. coli* (связывание достигает 40%), и весьма слабо связывает гомологичный олигорибонуклеотид (1—2%). Слабо взаимодействуют с

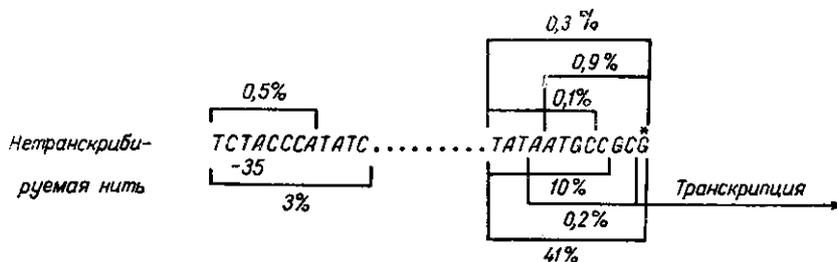


Рис. 2. Локализация синтетических олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в опытах по связыванию РНК-полимеразой *E. coli* в составе нетранскрибируемой нити промотора *E. coli*. Стрелкой обозначено направление транскрипции. РНК-полимеразы и олигорибонуклеотиды взяты в молярном соотношении 1:10. Верхними линиями обозначены олигорибонуклеотиды, нижними — олигодезоксирибонуклеотиды, использованные для связывания. Цифры над линиями обозначают процент связывания РНК-полимеразой *E. coli* соответствующих олигонуклеотидов

Fig. 2. Location of synthetic oligoribo- and oligodeoxyribonucleotides employed in experiments on binding of the *E. coli* RNA polymerase within the non-transcribed DNA strand of *E. coli* *src* promoter. An arrow shows a site of transcription initiation. The upper lines indicate oligoribonucleotides employed for binding. The lower lines — oligodeoxyribonucleotides. Figures above lines show efficiency of oligonucleotides binding (%) of the corresponding oligonucleotides. Molar ratio of RNA polymerase to oligonucleotides is 1:10

РНК-полимеразой *E. coli* также октарибонуклеотиды, гомологичные «-10»- и «-35»-областям промотора рибосомных генов *E. coli*. Однонитчатые олигодезоксирибонуклеотиды, узнаваемые и связываемые РНК-полимеразой *E. coli*, относятся к нетранскрибируемой нити «-10»-области гомологии промоторов генов *E. coli* и включают блок Прибнова с примыкающими к нему нуклеотидами вплоть до старта транскрипции. Представляется вероятным, что фермент взаимодействует с такой последовательностью нуклеотидов в составе локально расплетенной ДНК, образуя с ней открытый комплекс. Олигорибонуклеотид, гомологичный подобному олигодезоксирибонуклеотиду, не опознается и не связывается РНК-полимеразой *E. coli* с такой высокой эффективностью.

Олигорибонуклеотиды, идентичные *src*-промотору *E. coli* (нетранскрибируемая нить)  
Oligoribonucleotides identical the non-transcribed DNA strand of *E. coli* *src* promoter

Последовательность	Локализация в промоторе (область)	Связывание РНК-полимеразой <i>E. coli</i> , %
5'-UAUAAUGCCGCG	«-10»	0,3
5'-UAUAAUGC	«-10»	0,1
5'-AUGCCGCG	«-10»	0,9
5'-UCUACCCAUUC	«-35»	0,5

Полученные результаты позволяют заключить, что специфически узнаваемые и связываемые РНК-полимеразой *E. coli* олигорибонуклеотиды являются аналогами каких-то других, отличных от промоторных, регуляторных участков. В пользу этого свидетельствуют полученные нами данные о том, что специфически связываемые олигорибонуклеотиды не конкурируют со специфическими дезоксирибонуклеотидными последовательностями за сайты связывания на РНК-полимеразе [17], располагая, очевидно, собственными участками связывания.

OLIGORIBONUCLEOTIDES SPECIFICALLY BOUND BY DNA-DEPENDENT RNA  
POLYMERASE ARE NOT ANALOGS OF THE PROMOTER REGIONS  
OF THE BACTERIAL ENZYME-INTERACTING GENES

L. K. Savinkova, A. A. Sokolenko, V. L. Knorre,  
R. I. Salganik, A. G. Veniyaminova, M. N. Repkova

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch  
of Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk  
Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch  
of Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

Summary

Authors have verified previously advanced hypothesis that the oligoribonucleotides selectively bound by the *E. coli* (T7 and T3) RNA polymerase mimic the promoter regions of DNA. It is shown that oligoribonucleotides homologous to the «-10» region of the promoter of the nontranscribed DNA strand are not bound by *E. coli* RNA polymerase and mimic the other specific signals.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Selective binding of oligoribonucleotides by E. coli RNA-polymerase and their effect on DNA-dependent RNA synthesis* / L. Ju. Efimova, V. L. Knorre, L. K. Savinkova, R. I. Salganik // FEBS Lett.— 1975.— 58, N 2.— P. 359—362.
2. *Изучение условий специфического связывания олигорибонуклеотидов с РНК-полимеразой E. coli* / Л. Ю. Ефимова, В. Л. Кнорре, С. К. Василенко и др. // Молекуляр. биология.— 1976.— 10, № 2.— С. 378—385.
3. *Избирательное связывание олигорибонуклеотидов РНК-полимеразой, индуцированной фагом Т7* / Л. К. Савинкова, Л. Ю. Ефимова, В. Л. Кнорре, Р. И. Салганик // Там же.— 1978.— 12, № 6.— С. 1313—1318.
4. *Образование специфических комплексов Т3 РНК-полимеразы с олигорибонуклеотидами и торможение ДНК-зависимого синтеза РНК* / Л. Ю. Ефимова, Л. К. Савинкова, В. Л. Кнорре и др. // Там же.— 1980.— 14, № 4.— С. 734—742.
5. *Markiewicz W. T., Biola E., Kierzek R. Application of the tetraisopropylsiloxane-1,3-diyl group in the chemical synthesis of oligoribonucleotides* // Bull. Pol. Acad. Sci. Ser. sci. chem.— 1984.— 32, N 11—12.— P. 433—451.
6. *Использование салицилхлорфосфина для синтеза рибонуклеозид-3'- и 5'-Н-фосфинов* / А. Г. Веньяминова, Н. И. Комарова, А. С. Левина, М. Н. Репкова // Биоорг. химия.— 1988.— 14, № 4.— С. 484—489.
7. *Ломакин А. И., Ястребов С. И., Попов С. Г. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. 1. Исследование носителей на основе силикагеля марки «силхром»* // Там же.— 1985.— 11, № 7.— С. 920—926.
8. *Применение N-метилимидазолидного фосфотриэфириного метода для получения олигонуклеотидов, полезных при изучении рекомбинантных ДНК* / В. А. Ефимов, А. А. Бурякова, С. В. Ревердатто, О. Г. Чахмахчева // Там же.— 1983.— 9, № 10.— С. 1367—1381.
9. *Синтез олигорибонуклеотидов через рибонуклеозид-Н-фосфонаты* / А. Г. Веньяминова, А. С. Левина, З. А. Косолапова, М. Н. Репкова // Там же.— 1987.— 13, № 11.— С. 1588—1590.
10. *А. с. 1153976 / Способ получения сорбента* / С. И. Ястребов // Открытия. Изобретения.— 1985.— № 17.— С. 28.
11. *Donos-Keller H., Maxam A., Gilbert W. Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA* // Nucl. Acids Res.— 1977.— 4, N 8.— P. 25—38.
12. *Кнорре В. Л., Ефимова Л. Ю., Салганик Р. И. Влияние олигорибонуклеотидов, избирательно связываемых РНК-полимеразой E. coli, на ДНК-зависимый синтез РНК* // Молекуляр. биология.— 1976.— 10, № 3.— С. 604—608.
13. *MinKley E. G. Transcription of the early region of bacteriophage T7: specificity and selectivity in vitro initiation of RNA synthesis* // J. Mol. Biol.— 1974.— 83, N 3.
14. *Chamberlin M., MacKath J., WasKell L. New RNA polymerase from E. coli infected with bacteriophage T7* // Nature.— 1970.— 228, N 1.— P. 227—231.
15. *Fidelity of in vitro transcription of the T3 deoxyribonucleic acid by bacteriophage T3-induced ribonucleic acid polymerase and E. coli ribonucleic acid polymerase* / P. R. Chakraborty, P. Bandyopadhyay, H. U. Huang, U. Miftra // J. Biol. Chem.— 1974.— 249, N 12.— С. 6901—6909.
16. *Савинкова Л. К., Кнорре В. Л., Салганик Р. И. Избирательное связывание определенных нуклеотидных последовательностей промоторов генов E. coli и фага Т7 с соответствующими РНК-полимеразами* // Докл. АН СССР.— 1983.— 270, № 6.
17. *Кнорре В. Л., Савинкова Л. К., Салганик Р. И. Олигонуклеотидные последовательности, избирательно связываемые РНК-полимеразой E. coli* // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 6.— С. 283—292.

Ин-т цитологии и генетики Сиб. отд-ния АН СССР,  
Новосибирск  
Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР,  
Новосибирск

Получено 11.10.89