

31. Ингибирование биосинтеза ДНК в эмбрионах морских ежей с помощью 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозидов / М. К. Куханова, С. В. Кочеткова, А. А. Краевский и др.— Биохимия, 1983, 48, № 10, с. 1747—1751.

НИИ эксперим. кардиологии ВКНЦ АМН СССР,
Москва
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Ин-т физиологии АН ГССР, Тбилиси

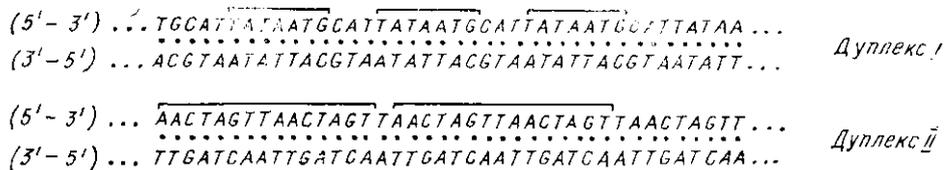
Получено 22.01.85

УДК 577.214.625+577.214.42

ТРАНСКРИПЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ДВУТЯЖЕВЫХ ПОЛИДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ПОВТОРЯЮЩИМИСЯ ФРАГМЕНТАМИ ПРОМОТОРОВ

О. Н. Королева, В. Л. Друца, З. А. Шабарова

В нашей лаборатории уже в течение нескольких лет ведутся всесторонние исследования свойств синтетических двутяжевых полидезоксирибонуклеотидов, содержащих 8÷12-звенные повторы. В рамках этих исследований нами были получены полинуклеотиды с регулярно повторяющимися элементами промоторов: «идеальной» последовательностью Прибноу (дуплекс I) и областью «-10»-го нуклеотида *trp*-промоторов (дуплекс II):



Ранее нами показано, что оба дуплекса способны образовывать устойчивые к гепарину долгоживущие комплексы с РНК-полимеразой *E. coli* (периоды полураспада 200 и 30 мин соответственно) [1]. В настоящем сообщении речь пойдет о результатах исследования транскрипционной активности *in vitro* и *in vivo* указанных синтетических полимеров.

Исследование транскрипции *in vitro* в присутствии высокой концентрации (0,1 мМ) рибонуклеозидтрифосфатов и избытка РНК-полимеразы *E. coli* показало, что полимер II является в 2,5 раза более эффективной матрицей, чем полимер I. При этом наблюдается воспроизводимая неравномерность распределения интенсивности полос транскриптов: для полимера I характерна периодичность, соответствующая 10 нуклеотидным звеньям, а для полимера II — 4 звеньям. Эти данные весьма трудно интерпретируемы, поскольку в условиях проведения реакции инициация транскрипции может происходить не только с определенных мест внутри ДНК-дуплексов (как это можно было ожидать, учитывая наличие фрагментов промоторов), но также с концов и нерепарированных разрывов [2]. Кроме того, при транскрипции матриц, содержащих элементы поворотной симметрии, может происходить преждевременная терминация транскрипции, чему способствует образование «шпилек» в синтезируемой РНК.

С целью исключить или по крайней мере резко понизить инициацию транскрипции с концов или одноцепочечных разрывов в полимерах I и II была проведена транскрипция в присутствии гепарина. При этом общее количество транскриптов после 15-минутной инкубации с ферментом снижалось для дуплекса I на 12%, а для дуплекса II — на 30% и обнаруживалась заметная периодичность (совпадающая с

периодичностью матриц) в распределении количеств синтезируемых РНК по длинам (рис. 1, см. вклейку). Учитывая эти данные, можно предположить, что транскрипция с полимеров I и II в присутствии гепарина в значительной степени инициируется устойчивыми к гепарину комплексами и происходит с определенных мест внутри полимеров I и II. Мы попытались экспериментально установить преимущественные места инициации прежде всего внутри полимера I. Для этого было проведено сравнительное исследование способности различных праймеров, добавленных в высокой концентрации (дирибонуклеозидфосфатов,

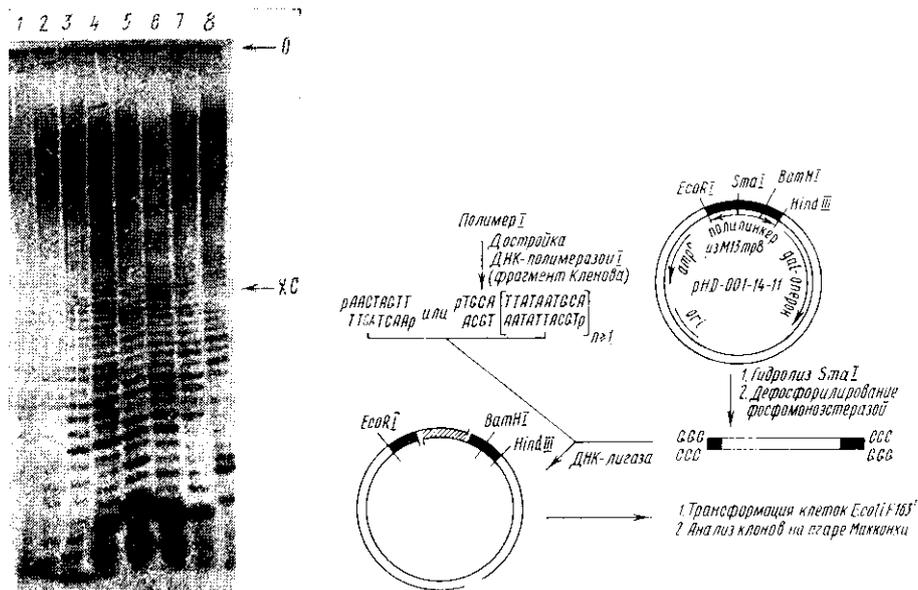


Рис. 2. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20 %-ном полиакриламидном геле продуктов транскрипции полимера I, стимулируемой праймерами: rpG (2); rpA (3); rApU (4); rApA (5); rUpA (6); rCrA (7); rGpC (8); 1 — транскрипция в отсутствие праймеров. Концентрация каждого rNTP — 2,5 мкМ. Остальные условия, как на рис. 1.

Fig. 2. Polyacrylamide gel (20 %) electrophoresis of ^{32}P -labelled transcripts, synthesized from the polymer I. Transcription was stimulated by primers: rpG (2), rpA (3), rApU (4), rApA (5), rUpA (6), rCrA (7), rGpC (8). 1 — transcription without primers. The concentration of each rNTP is 2.5 μM . The other conditions are as in Fig. 1.

Рис. 3. Схема конструирования плазмид, использованных для качественной оценки промоторной активности *in vivo* олигомеров, содержащих фрагменты природных промоторов.

Fig. 3. Construction of the plasmids used for testing the *in vivo* promoter activity of synthetic oligomers containing the promoter fragments.

5'-рибонуклеотидов), стимулировать инициацию транскрипции при низких концентрациях рибонуклеозидтрифосфатов. Известно, что для промоторов наибольшая стимуляция *in vitro* в таких условиях достигается в случае праймеров, комплементарных матричной цепи вблизи «естественной» промоторспецифической точки инициации транскрипции [3]. В случае полимера I наибольшую стимуляцию синтеза РНК (в 3 раза) вызывали праймеры rApA, rUpA, rApU, а также мононуклеотид rpA (рис. 2). Использование неравномерного распределения интенсивности полос транскриптов в полиакриламидном геле (обусловленного образованием РНК-полимеразой «пауз» в строго определенных местах) позволило нам более точно локализовать места преимущественной инициации синтеза РНК с полимера I. Эти места указаны на схеме ломаными стрелками



Установленные таким образом точки инициации транскрипции располагаются на расстоянии четырех нуклеотидных звеньев, от последовательности Прибной ТАТААТГ. Это наблюдение хорошо согласуется с многочисленными данными литературы о том, что в природных промоторах точка инициации транскрипции обычно расположена на расстоянии 4÷7 нуклеотидных звеньев от последовательности Прибной [4].

Аналогично были установлены возможные места инициации транскрипции внутри дуплекса II

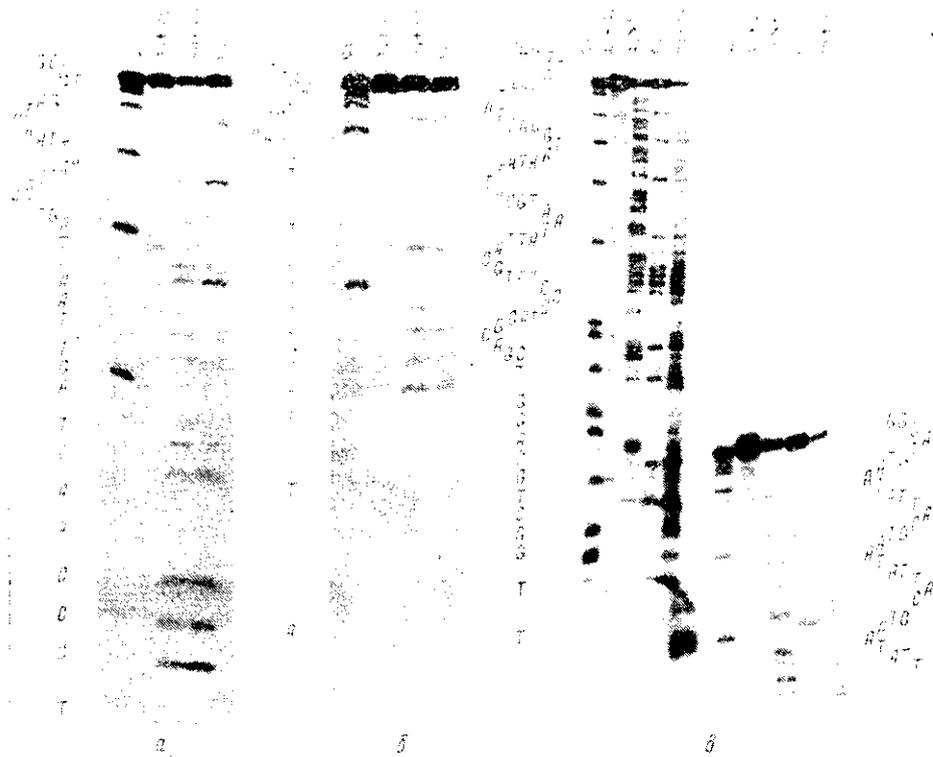
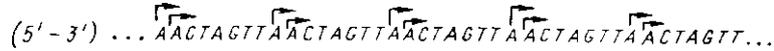


Рис. 4. Анализ по методу Максама—Гилберта [8] (электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле) первичной структуры малых фрагментов *EcoRI/BamHI* (а, б) и *HindIII/EcoRI* (в) плазмид со вставками синтетических олигомеров (pAACTAGTT)₄ (а), pTGCATTATAATGCA (б) и pTGCA(TTATAATGCA)₄ (в).

Fig. 4. Sequence analysis (12% polyacrylamide gel electrophoresis) of small *EcoRI/BamHI* (а, б) or *HindIII/EcoRI* (в) fragments of the plasmids containing the synthetic oligomers (pAACTAGTT)₄ (а), pTGCATTATAATGCA (б) and pTGCA(TTATAATGCA)₄ (в).

Следует отметить, что наблюдаемая во всех экспериментах с использованием праймеров периодичность (совпадающая с периодичностью соответствующих матриц) в распределении количеств синтезируемых транскриптов разной длины является, вероятно, следствием образования РНК-полимеразой пауз на стадии элонгации (например рис. 2). Используя разрабатываемый в лаборатории Р. Ш. Бибилашвили подход, связанный с ингибиторным анализом РНК, мы установили в полимерах I и II группы нуклеотидов, обуславливающие образование таких пауз. Это тринуклеотиды АТГ, GCA, САТ, АГТ и GTT, которые, как известно, специфически замедляют также транскрипцию и природных аperiodических матриц [5].

Синтетические периодические ДНК-дуплексы можно использовать как матрицы для изучения такого этапа транскрипции, как элонгация.

Выявленные особенности транскрипции *in vitro* ДНК-подобных полимеров I и II свидетельствуют о наличии у них некоторых свойств, подобных свойствам промоторов. Однако эти результаты еще не дают оснований сделать более определенные выводы об их способности специфически инициировать транскрипцию, что присуще природным промоторам. В связи с этим мы предприняли попытку оценить способность синтезированных фрагментов промоторов инициировать синтез РНК *in vivo*. Для этого была использована плазмида *pHD-001-14-11*, любезно предоставленная в наше распоряжение Г. Фрицем (Кельнский ун-т, ФРГ). Эта плазмида сконструирована на базе плазмиды *pBR322*, часть гена устойчивости к тетрациклину которой заменена галактозным опероном *E. coli*. Кроме того, в плазмиде *pHD-001-14-11* фрагмент *EcoRI/HindIII*, содержащий промоторно-операторную область *gal*-операона, заменен на полилинкерную *EcoRI/HindIII*-последовательность из ДНК фага *M13mp8*. Получить экспрессию *gal*-операона в такой плазмиде возможно только при введении перед ним (например в полилинкерную область) последовательности, способной инициировать транскрипцию. Если далее трансформировать вновь полученной плазмидой клетки *E. coli* штамма, дефектного по *gal*-оперону, и растить их на агаре Макконки, то клоны, в которых есть экспрессия *gal*-операона, можно легко тестировать по ярко-малиновой окраске колоний [6].

Использованная нами схема конструирования плазмид, содержащих олигомеры окта- и декануклеотидов, показана на рис. 3. Введение синтетических олигомеров проводили по единой схеме — тупыми концами по месту разрыва плазмиды *pHD-001-14-11* эндонуклеазой *SmaI*. При этом полимер I, полученный ферментативной поликонденсацией рТGCАТТАТАА и содержащий 5'-концевые одотяжевые последовательности TGCA, достраивали ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) в присутствии dNTP. Трансформированные полученные плазмиды в стандартных условиях (обработка на холоду 0,1 М раствором CaCl₂) клетки дефектного по *gal*-оперону штамма *E. coli F165* растили на Макконки-агаре, содержащем антибиотик ампициллин (50 мкг/мл). Из бесцветных и окрашенных в ярко-малиновый цвет колоний выделяли плазмидную ДНК и определяли ее первичную структуру в *EcoRI/HindIII*-области. Примеры анализа плазмид, содержащих моно- и тетрамеры окта- и декануклеотидов, показаны на рис. 4.

Эффективную экспрессию *gal*-операона можно наблюдать только в клетках, содержащих плазмиды со вставками, производными декануклеотида TGCАТТАТАА. Причем минимальной структурой, инициировавшей экспрессию *gal*-операона, была последовательность

... CCC TTT CGT CTT CAAGAA TCCCTGCАТТАТАА TCGAGGGGATCCGTCGA... → *gal*-оперон,

содержащая из известных в настоящее время характерных структурных элементов прокариотических промоторов только последовательность Прибноу. Олигомеры октануклеотида ААСТАGTT экспрессии *gal*-операона не вызывали. Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы о важности последовательности Прибноу в функционировании промоторов, а также с данными о «несовершенстве» «—10»-ой области *trp*-промоторов [7].

Таким образом, приведенные в данном сообщении эксперименты показали возможность использования синтетических ДНК-дуплексов с повторяющимися олигонуклеотидными фрагментами для изучения отдельных этапов процесса транскрипции.

TRANSCRIPTION OF THE SYNTHETIC DNA DUPLEXES
WITH REPEATS OF PROMOTER FRAGMENTS

O. N. Koroleva, V. L. Druksa, Z. A. Shabarova
Chemical Department and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology
and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov University, Moscow, USSR

Summary

Peculiarities of the *in vitro* and *in vivo* transcription of synthetic DNA duplexes containing the repeats of the «ideal» Pribnow box (period 10 bp) and —10th region of trp-promoters (period 16 bp) are studied. It is shown that these polymers can be effectively transcribed *in vitro* by *E. coli* RNA polymerase in the presence of heparin. The predominant *in vitro* transcription initiation sites in these polymers were revealed. It is shown that relatively short synthetic oligonucleotides containing the Pribnow box as bacterial plasmid constituents can initiate the *in vivo* RNA synthesis like natural promoters.

1. Королева О. Н., Шабарова З. А., Бибилашвили Р. Ш. Взаимодействие РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК-дуплексами, содержащими повторы.— Молекуляр. биология, 1985, 19, № 2, с. 516—523.
2. Krakow J. S., Rhodes G., Jovin Th. M. RNA polymerase: catalytic mechanisms and inhibitors.— In: RNA polymerase / Eds R. Losick, M. Chamberlin.— New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1976, p. 127—157.
3. Downey K. M., Jurmark B. S., So A. G. Determination of nucleotide sequences at promoter regions by the use of dinucleotides.— Biochemistry, 1971, 10, N 26, p. 4970—4975.
4. Rosenberg M., Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription.— Ann. Rev. Genet., 1979, 13, p. 319—353.
5. Зависимость между первичной структурой РНК и неравномерностью ее элонгации *in vitro* РНК-полимеразой из *Escherichia coli*. Модель / В. А. Айвазашвили, Р. Ш. Бибилашвили, Р. М. Вартикян, Т. А. Кутателадзе.— Молекуляр. биология, 1981, 15, № 4, с. 915—929.
6. Rosenberg M., McKenney K., Schümperli D. Use of the *E. coli* galactokinase gene to study prokaryotic and eukaryotic gene control signals.— In: Promoters: structure and function / Eds R. L. Rodriguez, M. J. Chamberlin.— New York: Praeger Publishers, 1982, p. 387—406.
7. Russel D. R., Bennet G. N. Construction and analysis of *in vivo* activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the —35 to —10 spacing.— Gene, 1982, 20, N 2, p. 231—243.
8. Maxam A. M., Gilbert W. Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages.— Meth. Enzymol., 1980, 65, p. 499—560.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 22.01.85