

**ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ,
ИЗБИРАТЕЛЬНО СВЯЗЫВАЕМЫЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗой *E. COLI****

В. Л. Кнорре, Л. К. Савинкова, Р. И. Салганик

Начальная стадия транскрипции обеспечивается взаимодействием РНК-полимеразы с промотором при образовании стабильного комплекса. Узнавание РНК-полимеразой определенных последовательностей дезоксирибонуклеотидов в участках ДНК, относящихся к промотору, является необходимым условием транскрипции генов.

Для идентификации узнаваемых ферментом нуклеотидных последовательностей в ряде работ были использованы различные подходы. В их числе выделение участков ДНК, защищаемых РНК-полимеразой от гидролиза нуклеазами или от химической модификации; статистическая модификация оснований в ДНК и выявление тех оснований, которые должны сохраниться интактными для участия в связывании фермента; индукция точковых мутаций с этой целью; конструирование ДНК с делециями, которые нарушают связывание РНК-полимеразы и, наконец, определение нуклеотидных последовательностей в защищенных РНК-полимеразой или функционально значимых делетированных участках [1—3].

В результате этих исследований было установлено, что в 5'-фланкирующих участках прокариотических генов в составе промоторов имеются гомологичные последовательности нуклеотидов, взаимодействующие с ферментом. Это расположенные вблизи точки инициации транскрипции шесть пар нуклеотидов, именуемые блоком Прибнау или «-10» последовательностью, и вверх от них (в сторону, противоположную направлению транскрипции) шесть пар нуклеотидов, известных как «-35» последовательность [1, 2].

Считают, что последовательность «-35» является местом узнавания промотора РНК-полимеразой, а участок «-10» служит местом образования открытого комплекса с ферментом [1]. Однако эти исследования не привели к установлению протяженности и нуклеотидных последовательностей участка промотора, с которым связывается РНК-полимераза. В настоящей работе для решения этих задач были развиты новые подходы.

Для идентификации нуклеотидных последовательностей, узнаваемых и связываемых РНК-полимеразами, использовали эндонуклеазные гидролизаты природных ДНК, содержащие статистические наборы олигонуклеотидов. При инкубации с РНК-полимеразой *E. coli* фермент исчерпывающе извлекал и связывал только небольшую часть аффинных олигонуклеотидов. Отделение таких олигонуклеотидов от фермента позволило охарактеризовать их: определить оптимальные размеры, условия связывания и ряд важных свойств [4].

Аналогичный прием был использован для идентификации связываемых РНК-полимеразами олигорибонуклеотидов [5—8]. В этих опытах использовали РНК-полимеразы *E. coli* и фагов T3 и T7. Однако получение индивидуальных олигонуклеотидов и секвенирование их было затруднено сложностью изоплитного набора олигомеров, связываемых ферментами.

Для установления избирательно связываемых нуклеотидных последовательностей нами был использован ряд синтетических олигодезоксирибонуклеотидов, относящихся к «-35» и «-10» районам промоторов *E. coli* [9].

Опыты по связыванию таких олигодезоксирибонуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* показали, что олигонуклеотиды из «-35» области прак-

* Продолжение публикаций материалов совещания «Молекулярная биология матричного синтеза ДНК» (начало см. № 5).

тически не связываются ферментом, тогда как олигонуклеотиды «—10» области, включающие Прибноу-блок с фланкирующими его нуклеотидами, связываются прочно.

Оказалось, что олигодезокси- и олигорибонуклеотиды не конкурируют за фермент. Не конкурируют между собой за фермент и комплементарные олигодезоксинуклеотиды, избирательно связываемые РНК-полимеразой *E. coli*.

Обсуждено функциональное значение избирательного взаимодействия РНК-полимераз с определенными последовательностями однонитевых олигодезокси- и олигорибонуклеотидов.

Избирательное связывание РНК-полимеразой *E. coli* олигодезоксинуклеотидов из изоплитных статистических наборов. РНК-полимеразу *E. coli* инкубировали с изо-

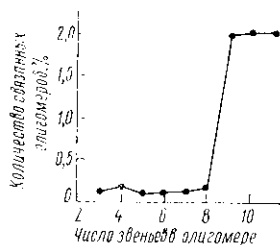


Рис. 1. Зависимость связывания РНК-полимеразой *E. coli* олигодезоксинуклеотидов от их длины.

Fig. 1. Binding of oligodeoxynucleotides by *E. coli* RNA polymerase depending on their length.

Таблица 1

Исчерпывающее связывание РНК-полимеразой *E. coli* олигодезоксирибонуклеотидов из изоплитных статистических наборов

Exhaustive binding of oligodeoxynucleotides from the isoplitth random mixtures by the E. coli RNA polymerase

Длина олиго. дезокси-нуклеотидов	Молярное соотношение РНК-полимераза: олигонуклеотиды	Связывание	
		Первичное	Вторичное
9	1 : 50	1,80	0,17
10	1 : 30	1,90	0,21

плитными наборами олигодезоксинуклеотидов, полученных гидролизом ДНК *E. coli* неспецифической эндонуклеазой *Serratia marcescens* [4]. Олигонуклеотиды разделяли по длине хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-25 в 7 М мочеvine и метили ^{32}P в 5'-положении полинуклеотидкиназой фага T4, как описано ранее [5]. Для инкубации с РНК-полимеразой *E. coli* использовали наборы ^{32}P -олигодезоксинуклеотидов длиной от 3 до 11 звеньев. Связавшиеся ферментом олигодезоксинуклеотиды отделяли от несвязавшихся гель-фильтрацией [6].

Из рис. 1 видно, что олигонуклеотиды длиной от 3 до 8 звеньев связываются ферментом в очень малых количествах (0,2—0,3 %); связывание резко возрастает (до 2 %) при длине олигонуклеотидов 9 звеньев и более. Эти данные позволяют предположить, что связываемые ферментом участки промотора должны иметь длину не менее 9 нуклеотидов. При избытке фермента он исчерпывающе связывает из смеси небольшое количество определенных нонадезоксинуклеотидов. Введение новой порции РНК-полимеразы *E. coli* в эту смесь после отделения находящегося там фермента вместе со связанными олигонуклеотидами не приводит к их дополнительному связыванию. Эти данные свидетельствуют, очевидно, о том, что фермент узнает и связывает ограниченное количество олигонуклеотидов, которые характеризуются определенной нуклеотидной последовательностью (табл. 1).

Существенно, что оптимум величины рН при связывании олигодезоксинуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* совпадает с оптимумом активности фермента. При экстремальных значениях рН — ниже 6,0 и выше 9,0, когда падает активность фермента, резко снижается и его способность связывать олигодезоксинуклеотиды (рис. 2). Эти данные подтверждают функциональный характер такого взаимодействия, которое может имитировать связывание фермента с определенным участком промотора. Об этом же свидетельствует и изменение профиля седиментации РНК-полимеразы при избирательном связывании олиго-

дезоксинуклеотидов размерами 9 и более звеньев. При ультрацентрифугировании в градиенте глицерина (10—30 %) РНК-полимеразы *E. coli* обнаруживаются два пика, соответствующих мономерной форме фермента — 13S и димерной его форме — 23S. При связывании декадезоксинуклеотидов происходит переход фермента в более активную мономерную форму (рис. 3) подобно тому, как это имеет место при взаимодействии РНК-полимеразы с ДНК [10].

При хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе нонадезоксинуклеотидов, избирательно связываемых РНК-полимеразой *E. coli*, обнаруживается ряд пиков [4], что говорит, очевидно, о связывании ферментом олигонуклеотидов, отличающихся по составу. Это соответствует данным об отличиях даже в гомологичных «-35» и «-10» участках промоторов различных генов *E. coli* [1—3].

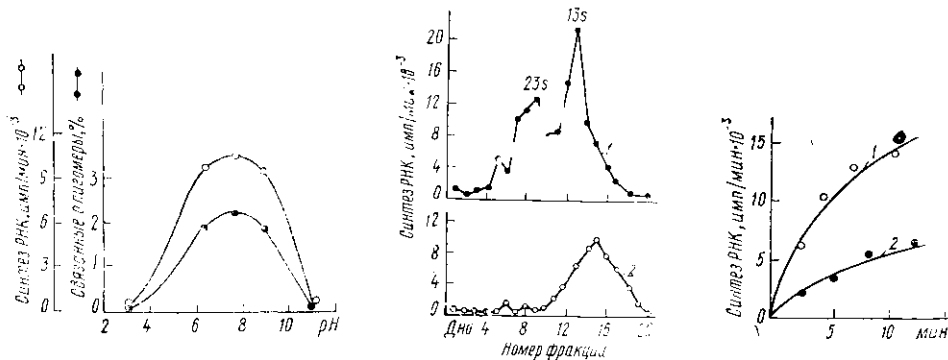


Рис. 2. Зависимость связывания олигодезоксинуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* от величины рН среды.

Fig. 2. Effect of pH on the binding of oligodeoxynucleotides by *E. coli* RNA polymerase.

Рис. 3. Изменение седиментационных свойств РНК-полимеразы *E. coli* при избирательном связывании олигодезоксинуклеотидов: 1 — профиль исходного препарата РНК-полимеразы; 2 — профиль комплекса РНК-полимеразы с олигодезоксинуклеотидами.

Fig. 3. Changes in the sedimentation properties of *E. coli* RNA polymerase under the selective binding of oligodeoxynucleotides.

Рис. 4. Торможение транскрипции олигодезоксинуклеотидами, избирательно связываемыми РНК-полимеразой *E. coli*: 1 — контроль; 2 — синтез РНК после преинкубации РНК-полимеразы с олигодезоксинуклеотидами.

Fig. 4. Inhibition of transcription by oligodeoxynucleotides selectively bound by *E. coli* RNA polymerase.

В пользу высокой специфичности связывания олигодезоксирибонуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* свидетельствует конкурентное торможение транскрипции ДНК олигодезоксинуклеотидами (длиною 9—11 звеньев), которые способны прочно связываться ферментом (рис. 4). Избирательно связанные РНК-полимеразой *E. coli* нонадезоксинуклеотиды отделяли от фермента тепловой денатурацией и вводили в транскрипционную систему с РНК-полимеразой и ДНК *E. coli*. Полученные данные говорят об ингибирующем действии их на транскрипцию. Такие олигонуклеотиды конкурируют с промоторами *E. coli* за фермент и являются, вероятно, структурными аналогами каких-то нуклеотидных последовательностей, ответственных за специфическое взаимодействие с ферментом.

Избирательное связывание РНК-полимеразой *E. coli* и РНК-полимеразами фагов Т3 и Т7 олигорибонуклеотидов из изоплитных статистических наборов их. Известно, что РНК-полимеразы способны образовывать тройные комплексы, удерживая транскрибируемую ДНК и синтезируемую РНК [11], а низкомолекулярные РНК, связываемые ферментом, могут служить модуляторами транскрипции [12]. В связи с этими данными мы исследовали способность РНК-полимераз избирательно связывать определенные олигорибонуклеотиды.

Изоплитные наборы олигорибонуклеотидов получали хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-25 в 7 М мочеvine ферментативных гидролизатов меченых РНК после расщепления их рибонуклеазой из яда кобры [6] или неспецифической эндонуклеазой *Serratia marcescens* [5]. Для этих целей синтезировали меченые РНК симметричной или асимметричной транскрипцией ДНК *E. coli* или ДНК фагов T3 и T7 с помощью РНК-полимеразы *E. coli* или РНК-полимераз фагов T3 и T7 соответственно, как описано [6—9].

Для инкубации с РНК-полимеразой *E. coli* использовали меченые олигорибонуклеотиды длиной от 2 до 10 звеньев, полученные в резуль-

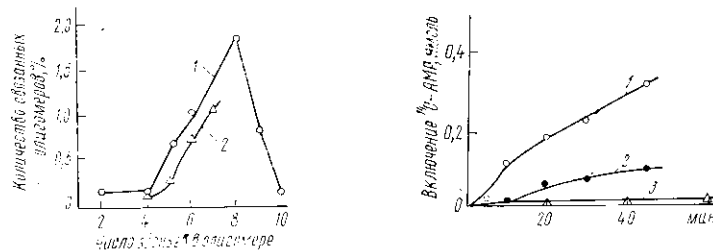


Рис. 5. Зависимость связывания РНК-полимеразами фага T7 (1) и *E. coli* (2) олигорибонуклеотидов от их длины.

Fig. 5. Binding of oligoribonucleotides by T7 RNA polymerase (1) and *E. coli* RNA polymerase (2) depending on their length.

Рис. 6. Торможение транскрипции олигорибонуклеотидами, избирательно связываемыми РНК-полимеразой *E. coli*: 1 — контроль; 2 — синтез РНК после преинкубации фермента с изоплитной смесью пентарибонуклеотидов (42 нмоль/мл); 3 — синтез РНК после преинкубации фермента с прочно связываемой фракцией пентарибонуклеотидов (0,4 нмоль/мл).

Fig. 6. Inhibition of transcription by oligoribonucleotides selectively bound by *E. coli* RNA polymerase.

тате ферментативного гидролиза РНК, симметрично транскрибированной РНК-полимеразой *E. coli* с обеих нитей ДНК *E. coli*.

Как видно из рис. 5, РНК-полимераза *E. coli* начинает связывать олигорибонуклеотиды при длине их 5 звеньев, наиболее интенсивно связывает при длине 8 звеньев, а при длине 9 звеньев происходит падение связывания. Оптимум рН для реакции связывания олигорибонуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* лежит в области 8,0, ионная сила раствора не должна превышать 0,2 М, а блокада SH-группы фермента р-хлормеркурийбензоатом ведет к потере РНК-полимеразой способности к связыванию олигорибонуклеотидов. Эти условия совпадают с условиями транскрипции РНК-полимеразой *E. coli* матричной ДНК.

РНК-полимераза, индуцируемая в *E. coli* фагом T3 (T3 РНК-полимераза), также начинает связывать олигорибонуклеотиды изоплитных смесей при длине их 5 звеньев.

Такой же способностью связывать олигорибонуклеотиды изоплитных смесей, начиная с пентануклеотидов, обладает РНК-полимераза, индуцируемая в *E. coli* фагом T7 (T7 РНК-полимераза); связывание достигает максимума при инкубации с октануклеотидами; при длине 9 звеньев происходит падение связывания, а декануклеотиды уже не образуют в заметных количествах комплексов с T7 РНК-полимеразой [7]. При избытке РНК-полимеразы в инкубационной смеси фермент исчерпывающе связывает олигорибонуклеотиды, которые он способен узнавать.

Оказалось, что связывание носит видоспецифический характер: РНК-полимеразы *E. coli*, T3 и T7 фагов связывают в основном опознаваемые каждой из них олигорибонуклеотиды.

В изоплитной статистической смеси ¹⁴C-гептарибонуклеотидов после исчерпывающего связывания определенной части их T3 РНК-полимеразой остаются олигорибонуклеотиды, специфически и неконкурентно связываемые РНК-полимеразами *E. coli* и фага T7. И наоборот,

после исчерпывающего связывания гептарибонуклеотидов РНК-полимеразы *E. coli* в смеси сохраняются олигонуклеотиды, избирательно связываемые T3 или T7 РНК-полимеразами. Специфическое связывание гептануклеотидов РНК-полимеразами в этих опытах составляло 0,8—2,3 %, а неспецифическое (на примере ³H-тетрарибонуклеотидов) — только 0,06—0,08 % [7, 8].

Таблица 2

Связывание РНК-полимеразой *E. coli* олигодезоксирибонуклеотидов, относящихся к «-10» и «-35» районам нетранскрибируемой нити ДНК в области *spc*-промотора *E. coli*

Binding of oligodeoxynucleotides related to the «-10» and «-35» regions of the nontranscribed DNA strand of spc-promoter by the E. coli DNA polymerase

Область промотора	№№ п/п	Олигонуклеотиды			Связывание с РНК-полимеразой, %
		Последовательность нуклеотидов	Длина	Локализация в промоторе	
«-10»	1	5' — TATAATGCCGCG — 3'	12	+1 до -11	41
	2	5' — TATAATGCC — 3'	9	-3 до -11	10
	3	5' — AATGCCGCG — 3'	9	+1 до -8	0,2
«-35»	4	5' — TCTACCCATATC — 3'	12	-25 до -36	3

Известно, что при высоком молярном соотношении РНК-полимераза *E. coli*: T7 ДНК фермент симметрично транскрибирует обе нити ДНК; в гомологичной же системе T7 РНК-полимераза — T7 ДНК даже при большом избытке фермента происходит асимметричная транскрипция только одной кодирующей нити T7 ДНК [13].

Наши опыты показали, что изоплитные смеси содержат узнаваемые РНК-полимеразой нуклеотидные последовательности только в тех случаях, когда гидролизу подвергали РНК, считываемую с обеих нитей ДНК [7]. Эти данные дают основание предположить, что узнаваемые РНК-полимеразой олигорибонуклеотиды содержат нуклеотидные последовательности, гомологичные тем, которые находятся в кодирующей нити ДНК (комплементарные некодирующей нити ДНК).

Подобно олигодезоксинуклеотидам олигорибонуклеотиды, избирательно связываемые РНК-полимеразой *E. coli*, способны весьма эффективно тормозить транскрипцию. Из рис. 6 видно, что избирательно связываемые РНК-полимеразой *E. coli* пентарибонуклеотиды полностью тормозят ДНК-зависимый синтез РНК в концентрации 0,4 нмоль/мл, тогда как исходная смесь пентарибонуклеотидов, где концентрация в 100 раз больше, только частично подавляет синтез РНК. Смесь пентарибонуклеотидов, из которой были исчерпаны избирательно связываемые ферментом олигорибонуклеотиды, вовсе не обладает способностью тормозить транскрипцию.

ДНК может успешно конкурировать с олигорибонуклеотидами за фермент при изменении их соотношения. Так, пента- или гексарибонуклеотиды, связанные избирательно РНК-полимеразой *E. coli*, полностью вытеснялись ДНК *E. coli* из комплекса с ферментом, когда концентрация ДНК становилась эквивалентной концентрации олигонуклеотидов [7].

Избирательное связывание РНК-полимеразой *E. coli* синтетических олигодезоксинуклеотидов с последовательностями, гомологичными «-10» и «-35» участкам промоторов *E. coli*. Приведенные выше данные говорят о способности РНК-полимераз связывать олигонуклеотиды определенных размеров и, очевидно, детерминированной первичной структуры. Однако гетерогенность состава таких связываемых ферментом олигонуклеотидов не позволила получить индивидуальные олигонуклеотиды и определить последовательность нуклеотидов в них.

Для решения этой задачи мы использовали синтетические олигодезоксинуклеотиды, первичная структура которых определялась двумя

обстоятельствами: 1) размеры их должны были быть не менее 9 звеньев, поскольку с нонадезоксинуклеотидов начинается интенсивное связывание олигодезоксинуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli*; 2) нуклеотидные последовательности их должны включать гомологичные «-35» и «-10» области промоторов, которые, судя по ряду данных [1-3], ответственны за узнавание и связывание фермента.

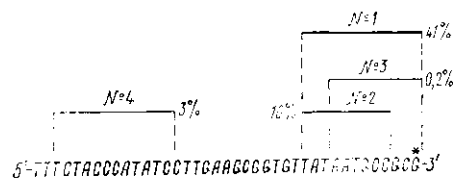


Fig. 7. Location of synthetic oligodeoxynucleotides employed in experiments of the *E. coli* RNA polymerase binding within the non-transcribed DNA strand of *E. coli* *spc*-promoter, and the efficiency of binding: «*» — a site of the transcription initiation; «-35» and «-10» regions are underlined; efficiency of oligodeoxynucleotide binding in % is indicated above the corresponding oligodeoxynucleotides.

Рис. 8. Локализация синтетических олигодезоксинуклеотидов, использованных в опытах по связыванию РНК-полимеразой *E. coli* в составе среднестатистического промотора *E. coli* и эффективность их связывания. Обозначения, как на рис. 7.

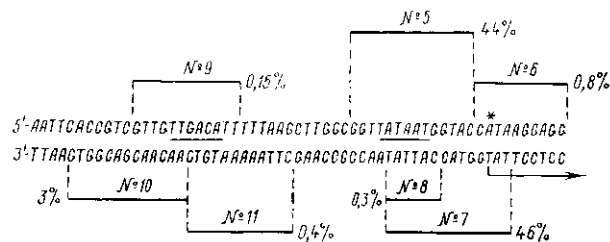


Fig. 8. Location of synthetic oligodeoxynucleotides employed in experiments of the *E. coli* RNA polymerase binding within the transcribed and non-transcribed strands of the statistically designed promoter and the efficiency of binding. The designations as in Fig. 7.

Таблица 3

Связывание РНК-полимеразами *E. coli* и фага T7 олигонуклеотидов, относящихся к транскрибируемой (Т) и нетранскрибируемой (НТ) нитям ДНК «-10» и «-35» районов среднестатистического промотора генов *E. coli*

Binding of oligodeoxynucleotides related to the «-10» and «-35» regions of the transcribed (T) and non-transcribed (NT) DNA strands of the statistically designed *E. coli* promoter by the *E. coli* and T7 phage RNA polymerases

Олигонуклеотиды						Связывание с РНК-полимеразами, %	
Область промотора	№№ п/п	Последовательность	Длина	Локализация в промоторе	Нить ДНК	<i>E. coli</i>	Фага T7
«-10»	5	5' — GGTTATAATGGTAC — 3'	14	-2 до -15	НТ	44	2,52
	6	5' — CATAAGGAG — 3'	10	-1 до +5	—	0,77	—
	7	5' — TATGGTACCATTAT — 3'	14	+3 до -11	Т	46	2,8
	8	5' — CATTAT — 3'	6	-6 до -11	—	0,3	—
	9	5' — GTTGTTGACATT — 3'	12	-28 до -39	НТ	0,15	—
«-35»	10	5' — ААСААСGACGGTG — 3'	13	-34 до -46	Т	3,4	0,023
	11	5' — СГТАААААТGTC — 3'	12	-22 до -33	—	0,38	0,05

Поскольку «-10» и «-35» области включают только по шесть пар нуклеотидов, то естественно, что синтетические олигонуклеотиды размером ≥ 9 звеньев должны содержать и последовательности нуклеотидов, фланкирующие эти участки.

В табл. 2 и 3 приведены структуры синтетических олигодезоксинуклеотидов, относящихся к «-10» и «-35», областям, и эффективность связывания их РНК-полимеразами *E. coli* и фага T7. Олигоде-

зоксинуклеотиды идентичны указанным на рис. 7 участкам транскрибируемой нити ДНК в «-10» и «-35» участках *spr*-промотора рибосомных генов *E. coli* или аналогичным участкам рассчитанного компьютерным анализом [14] среднестатистического промотора *E. coli* (рис. 8).

Данные, приведенные в табл. 2, указывают на то, что РНК-полимераза *E. coli* связывает с высокой эффективностью олигодезоксинуклеотид № 1 длиной 12 звеньев, включающий шесть нуклеотидов блока Прибноу и шесть фланкирующих его нуклеотидов, расположенных вниз от него к точке инициации транскрипции (рис. 8). Удаление трех крайних нуклеотидов фланкирующего участка (олигонуклеотид № 2) резко снижает эффективность связывания (с 41 до 10 %). Еще более нежелательным для связывания оказывается удаление трех крайних (с 5'-фланга) нуклеотидов блока Прибноу (олигонуклеотид № 3).

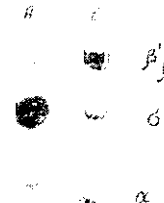


Рис. 9. Ковалентное связывание олигодезоксинуклеотидов, несущих алкилирующие группы на 5'-конце, с субъединицами РНК-полимеразы *E. coli*: А — автордиография геля; В — локализация субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*.

Fig. 9. Covalent binding of oligodeoxynucleotides carrying alkylating groups on the 5'-end with subunits of *E. coli* RNA polymerase.

Гексануклеотид блока Прибноу без фланкирующих последовательностей практически не связывается РНК-полимеразой *E. coli*.

Олигодезоксинуклеотид, включающий шесть нуклеотидов «-35» области и шесть нуклеотидов, фланкирующих его с 3'-конца, связываются РНК-полимеразой *E. coli* с очень низкой эффективностью.

Сходные данные были получены при изучении связывания олигодезоксинуклеотидов, относящихся к среднестатистическому промотору *E. coli* (табл. 3). Оказалось, что РНК-полимераза *E. coli* с высокой эффективностью связывает олигонуклеотид № 5 из нетранскрибируемой и олигонуклеотид № 7 из транскрибируемой нитей ДНК; оба они включают гексануклеотиды блока Прибноу и примыкающие к ним 5 или 6 нуклеотидов, расположенных вниз от них, к точке инициации транскрипции (рис. 9). Удаление нуклеотидов, относящихся к блоку Прибноу (олигонуклеотид № 6) или к фланкирующим этот блок снизу последовательностям (олигонуклеотид № 8), резко снижает эффективность связывания.

Все три олигодезоксинуклеотида (№№ 9, 10 и 11), включающие «-35» гексануклеотид с разными фланкирующими его последовательностями, связывались РНК-полимеразой *E. coli* с очень низкой эффективностью (рис. 9 и табл. 3).

Полученные данные позволяют заключить, что РНК-полимераза *E. coli* эффективно связывает олигодезоксинуклеотиды, которые включают блок Прибноу и примыкающие к нему снизу (по направлению к точке инициации транскрипции) 5 или 6 нуклеотидов. Такие олигодезоксинуклеотиды могут относиться к транскрибируемой или нетранскрибируемой нитям ДНК.

Связывание этих олигодезоксирибонуклеотидов, очевидно, видоспецифично, поскольку *T7* РНК-полимераза, например, очень слабо связывает олигонуклеотиды №№ 5 и 7, интенсивно связываемые РНК-полимеразой *E. coli* (табл. 3).

Олигодезоксинуклеотиды, интенсивно связываемые РНК-полимеразой *E. coli*, способны тормозить транскрипцию ДНК *E. coli*, вступая, по-видимому, в конкуренцию с промоторами за фермент [4].

Существенный интерес представляет способность РНК-полимеразы *E. coli* связывать однонитевые олигодезоксинуклеотиды, относящие-

ся к транскрибируемой и нетранскрибируемой нитям ДНК. Такие олигодезоксинуклеотиды, относящиеся к противоположным участкам «—10» области комплементарных нитей ДНК, не конкурируют за фермент и связываются, очевидно, независимо двумя разными сайтами. Эти данные подтверждают представление о том, что в «—10» районах промоторов образуются открытые комплексы, в которых РНК-полимераза прочно связывается одонитевыми участками локально расплетенной ДНК.

Олигодезоксинуклеотиды и олигорибонуклеотиды неконкурентно связываются РНК-полимеразой *E. coli*, присоединяясь к разным субъединицам фермента. Присоединяются ли олигодезокси- и олигорибонуклеотиды к одному и тому же функционально значимому сайту фермента? Конкурируют ли они между собой? Или же РНК-полимераза располагает двумя независимыми сайтами для них?

Для решения этих вопросов были поставлены специальные опыты, которые показали, что предварительное связывание РНК-полимеразой *E. coli* олигорибонуклеотидов не препятствует последующему связыванию олигодезоксинуклеотидов и наоборот (табл. 4). При одновременной инкубации с РНК-полимеразой *E. coli* они присоединяются к ферменту независимо друг от друга, не конкурируя между собой за сайт связывания.

Эти данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что РНК-полимеразы имеют отдельные сайты связывания для одонитевых ДНК и РНК. Такое предположение подтверждают данные о способности РНК-полимеразы образовывать тройной комплекс, присоединяя ДНК и РНК [11]. Возможно, что РНК, с которыми может связываться фермент в клетке, представляют собой низкомолекулярные формы ее, играющие регуляторную роль [12].

Если имеются отдельные сайты РНК-полимеразы для связывания олиго- или полидезоксинуклеотидов и олиго- или полирибонуклеотидов, то где располагаются они на ферменте? Присоединяются ли они к отдельным субъединицам или доменам РНК-полимеразы?

Для решения этого вопроса были использованы олигонуклеотиды, способные избирательно связываться РНК-полимеразой. Такие олигонуклеотиды оснащали реакционноспособными группировками; связавшись с РНК-полимеразой, они способны были затем ковалентно присоединиться к ферментному белку.

В этих опытах использовали эффективно связываемый РНК-полимеразой олигодезоксинуклеотид, включающий блок Прибноу и фланкирующие его с 3'-конца шесть нуклеотидов (олигонуклеотид № 7 — рис. 8, табл. 3).

Таблица 4

Неконкурентное связывание олигодезоксинуклеотидов и олигорибонуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli*

Non-competitive binding of oligodeoxy- and oligoribonucleotides by the E. coli RNA polymerase

Условия инкубации РНК-полимеразы <i>E. coli</i>	Связано олигонуклеотидов, пмоль		
	Олигорибонуклеотидов	Олигодезоксинуклеотидов	Сумма
¹⁴ С-октарибонуклеотиды	8,0	—	8,0
³² Р-нонадезоксинуклеотиды	—	8,4	8,4
Преинкубация с ¹⁴ С-октарибонуклеотидами и инкубация с ³² Р-нонадезоксинуклеотидами	8,0	8,4	16,4
Преинкубация с ³² Р-нон. дезоксинуклеотидами и инкубация с ³ Н-октарибонуклеотидами	8,0	8,0	16,0
Одновременная инкубация с ¹⁴ С-октарибонуклеотидами и ³² Р-нонадезоксирибонуклеотидами	8,0	8,4	16,4

Олигорибонуклеотиды были представлены изоплитной смесью гексарибонуклеотидов, содержащей последовательности, также избирательно связываемые РНК-полимеразой *E. coli*. К олигонуклеотидам через 5'-фосфамидную группу присоединяли алкилирующую β -хлорэтильную группировку, как описано в [15]. Модифицированные ^{32}P меченные олигодезоксинуклеотиды инкубировали с РНК-полимеразой *E. coli* (2 ч при комнатной температуре). После этого проводили электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях и автордиографию геля. Эти опыты показали, что олигодезоксинуклеотид, обладающий высоким сродством к РНК-полимеразе *E. coli* ковалентно связывается 5'-концом главным образом с σ -субъединицей фермента (рис. 9). Такой же модификации была подвергнута смесь ^{14}C -гексарибонуклеотидов, часть которых эффективно связывается РНК-полимеразой *E. coli*. Оказалось, что меченые гексарибонуклеотиды связываются 5'-концом главным образом β - и β' -субъединицами фермента (гель разрезали на полоски и просчитывали радиоактивность ковалентно связавшегося ^{14}C -олигомера). Результаты этих опытов подтверждают то, что олигодезокси- и олигорибонуклеотиды не конкурируют за РНК-полимеразу, поскольку связываются разными сайтами, расположенными на разных субъединицах фермента.

Из изложенных выше данных следует, что РНК-полимераза *E. coli* способна с высокой избирательностью связывать определенные олигодезоксинуклеотиды размерами не менее девяти и определенные олигорибонуклеотиды размерами не менее пяти мономеров. Это связывание осуществляется только интактным ферментом, сохраняющим каталитическую активность в условиях, оптимальных для транскрипции. Связывание олигонуклеотидов видоспецифично: олигонуклеотиды, присоединяемые РНК-полимеразой *E. coli* не опознаются РНК-полимеразами фагов T3 и T7 и наоборот.

Избирательно связываемые олигодезоксинуклеотиды относятся к «-10» области промоторов, включают блок Прибноу и нуклеотиды, примыкающие к нему со стороны точки инициации транскрипции.

Связываемые РНК-полимеразами олигодезокси- и олигорибонуклеотиды тормозят транскрипцию природных ДНК, очевидно, конкурируя с ними за функционально значимые сайты фермента.

Существенно, что фермент способен узнавать и связывать однोनитевые олигодезоксинуклеотиды; такие комплементарные последовательности не конкурируют между собой за участок связывания на ферменте. Не конкурируют с ними и избирательно связываемые олигорибонуклеотиды.

Данные, полученные в опытах с олигорибонуклеотидами, ковалентно связываемыми ферментом, не противоречат этим представлениям.

Согласно имеющимся данным роль σ -субъединицы РНК-полимеразы состоит в том, что она обеспечивает выбор специфических последовательностей на матрице ДНК в процессе инициации транскрипции [1]. С этих позиций понятна способность σ -субъединицы связывать олигодезоксинуклеотиды, относящиеся к «-10» области промотора. Способность РНК-полимераз связывать олигорибонуклеотиды при их длине >5 и не более 9 мономеров может быть связана с тем, что существуют стерические ограничения для более длинных последовательностей: при длине цепи в 8—10 нуклеотидов происходит освобождение РНК-продукта из состава тройного комплекса, где РНК-полимераза связана с ДНК-матрицей и синтезируемой РНК [11]. Нельзя, однако, исключить и того, что β - и β' -субъединицы способны узнавать и связывать определенные нуклеотидные последовательности регуляторных низкомолекулярных РНК, усиливающих или тормозящих транскрипцию [12].

OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES SELECTIVELY BOUND
BY *ESCHERICHIA COLI* RNA POLYMERASE

V. L. Knorre, L. K. Savinkova, R. I. Salganik

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

Summary

It is found that *E. coli* RNA polymerase selectively binds certain oligonucleotides from the random isoplith mixtures obtained by nuclease digestion of either DNA or RNA. The binding is realized only by catalytically active enzyme under conditions optimal for transcription. Using synthetic oligodeoxyribonucleotides of definite sequences is shown that the efficient binding occurs with oligonucleotides related to the «-10» promoter region comprising the Pribnow box and downstream flanking nucleotides up to the transcription initiation site. Oligonucleotides provided with 5'-terminal alkylating groups are covalently bound to RNA polymerase, σ -subunit being labelled with deoxyribonucleotide derivative and β, β' -subunits — with ribooligonucleotide ones.

1. Chamberlin M. J. The selectivity of transcription.— Ann. Rev. Biochem., 1974, 43, p. 721—775.
2. Kumar S. A. The structure and mechanism of action of bacterial DNA-dependent RNA polymerase.— Progr. Biophys. and Mol. Biol., 1981, 38, p. 165—210.
3. Hawley D. K., McClure W. R. Compilation and analysis of *E. coli* promoter DNA sequences.— Nucl. Acids Res., 1983, 11, N 8, p. 2237—2255.
4. Савинкова Л. К., Кнорре В. Л., Салганик Р. И. Избирательное связывание олигодезоксирибонуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* и их влияние на ДНК-зависимый синтез РНК.— Молекуляр. биология, 1984, 18, № 3, с. 637—642.
5. Изучение условий специфического связывания олигорибонуклеотидов с РНК-полимеразой *E. coli* / Л. Ю. Ефимова, В. Л. Кнорре, С. К. Василенко и др.— Там же, 1976, 10, № 2, с. 378—385.
6. Knorre V. L., Vasilenko S. V., Salganik R. I. Specific binding of oligoribonucleotide fractions to *E. coli* RNA polymerase.— FEBS Lett., 1973, 30, N 2, p. 229—230.
7. Избирательное связывание олигорибонуклеотидов РНК-полимеразой, индуцированной фагом T7 / Л. К. Савинкова, Л. Ю. Ефимова, В. Л. Кнорре, Р. И. Салганик.— Молекуляр. биология, 1978, 12, № 6, с. 1313—1318.
8. Кнорре В. Л., Ефимова Л. Ю., Салганик Р. И. Влияние олигорибонуклеотидов, избирательно связываемых РНК-полимеразой *E. coli*, на ДНК-зависимый синтез РНК.— Там же, 1976, 10, № 3, с. 604—608.
9. Савинкова Л. К., Кнорре В. Л., Салганик Р. И. Избирательное связывание определенных нуклеотидных последовательностей промоторов генов *E. coli* и фага T7 с соответствующими РНК-полимеразами.— Докл. АН СССР, 1983, 270, № 6, с. 1501—1504.
10. Template-induced dissociation of ribonucleic acid polymerase / D. Smith, A. Martinez, R. Ratliff et al.— Biochemistry, 1967, 6, N 15, p. 3057—3063.
11. Hansen U., McClure W. Role of the σ -subunit of *E. coli* RNA polymerase in initiation. I. Characterization of core enzyme open complexes.— J. Biol. Chem., 1980, 255, N 20, p. 9556—9563.
12. Gojobori T., Nei M. Inter-RNA homology and possible roles of small RNAs.— J. Mol. Evol., 1981, 17, N 4, p. 245—250.
13. Chamberlin M., MacRath J., Waskell L. New RNA polymerase from *E. coli* infected with bacteriophage T7.— Nature, 1970, 228, N 17, p. 227—231.
14. Scherer G., Walkinshaw M., Arnott S. A computer aided oligonucleotide analysis provides a model sequence for RNA polymerase-promoter recognition in *E. coli*.— Nucl. Acids Res., 1978, 5, N 10, p. 3759—3777.
15. Богачев В. С., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. Алкилирование нуклеиновых кислот и их компонентов. XIII. Алкилирование гуанозина и тРНК 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламином и 5'-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил] фосфамидом уридина.— Изв. СО АН СССР, 1973, 9, № 4, с. 97—104.

Ин-т цитологии и генетики СО АН СССР,
Новосибирск

Получено 22.01.85