

10. Walker R. T., RajBhandary U. L. Studies on polynucleotides // J. Biol. Chem.— 1972.— 247, N 15.— P. 4879—4892.
11. Aoyagi S., Inoue Y. Oligonucleotide studies // Ibid.— 1968.— 243, N 3.— P. 514—520.
12. Szer W., Kurylo-Borowska Z. Effect of edeine on aminoacyl-tRNA binding to ribosomes and its relationship to ribosomal binding sites // Biochim. et biophys. acta. 1970.— 224, N 2.— P. 477—486.
13. Kinetic aspects of tetracycline action on the acceptor (A) site of *Escherichia coli* ribosomes / Yu. P. Semenkov, E. M. Makarov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov // FEBS Lett.— 1982.— 144, N 1.— P. 125—129.
14. Binding of tRNA in different functional states to *Escherichia coli* ribosomes as measured by velocity sedimentation / M. Schmitt, U. Neugebauer, C. Bergmann et al. // Eur. J. Biochem.— 1982.— 127, N 5.— P. 525—529.
15. Кириллов С. В. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах // Прогр. науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1983.— С. 5—98 (Биол. химия.— Т. 18).
16. Effect of bases contiguous to AUG on translation initiation / M. C. Ganoza, P. Sullivan, C. Cunningham et al. // J. Biol. Chem.— 1982.— 257, N 14.— P. 8228—8232.

Ленингр. ин-т ядер. физики
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 06.06.86

УДК 577.214.42

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ДНК-ПОДОБНЫМИ ДУПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ПОВТОРЫ. ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ

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

Введение. Ранее в качестве моделей для изучения взаимодействия РНК-полимеразы *E. coli* с прокариотическими промоторами нами были предложены синтетические двуспиральные полинуклеотиды* с повторяющимися фрагментами промоторов [1]. В частности, были изучены некоторые свойства полимеров, содержащих повторы «идеальной» последовательности Прибноу (полимер I', схема 1). Оказалось, что они образуют с РНК-полимеразой устойчивые к гепарину транскрипционно активные комплексы с периодом полураспада ~230 мин [2], а в составе специальной промотор-тестирующей плазмиды они способны проявлять промотороподобные свойства, т. е. инициировать транскрипцию *in vivo* [3].

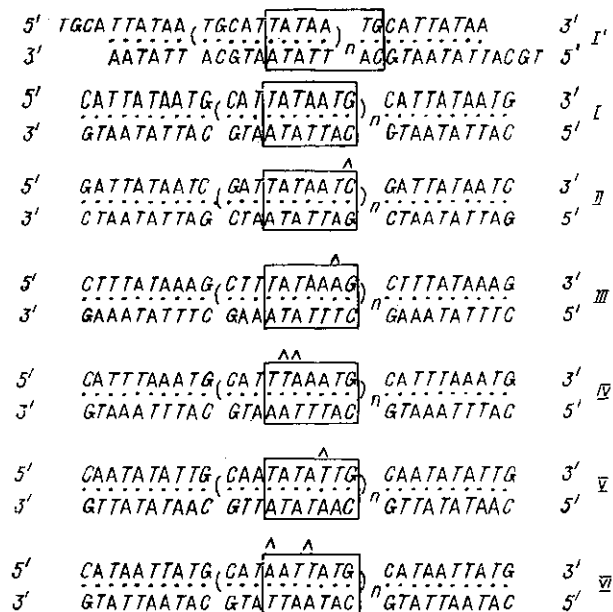
В продолжение этих исследований нами были синтезированы двуспиральные полинуклеотиды II—VI (схема 1), отличающиеся от уже изученного нами полимера I' незначительными изменениями в структуре повторяющегося фрагмента при сохранении того же нуклеотидного состава (содержание АТ-пар 80 %) и периодичности (10 пар нуклеотидов). Кроме того, был получен полимер I, практически полностью (за исключением концевых участков) идентичный по структуре полимеру I'.

На схеме I $\left(\begin{array}{c} \text{ТАТААТГ} \\ \text{1 2 3 4 5 6 7} \end{array} \right)$ — «идеальная» последовательность Прибноу

в пределах повторяющихся элементов синтетических дуплексов выделены последовательности, наиболее близкие к «идеальной» последовательности Прибноу. Значком сверху отмечены отклонения от полной гомологии. В настоящей работе предстояло выяснить, каким образом такие различия в структуре влияют на способность указанных полиме-

* Префикс d (дезокси) в сокращенном написании поли- и олигодезоксирибонуклеотидов здесь и в дальнейшем опущен.

ров взаимодействовать с РНК-полимеразой *E. coli*.



Материалы и методы. В работе использованы акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид («BDH», Великобритания), бычий сывороточный альбумин («Calbiochem», США), трис, rCTP, rGTP («Merck», ФРГ), rATP, rUTP («Serva», ФРГ), гепарин («Koch-Light Laboratories», Великобритания), γ - ^{32}P -rATP с удельной радиоактивностью 37 ТБк/ммоль (ВО «Изотоп», Моск. отд-ние), α - ^{32}P -rGTP с удельной радиоактивностью 111 и 11 ТБк/ммоль («Amersham», Великобритания), нитроцеллюлозные фильтры (тип HAWP, диаметр пор 0,45 мкм; «Millipore», США).

Ферменты полинуклеотидкиназа фага T4 (КФ 2.7.1.78) с удельной активностью 2000 ед. акт./мл; ДНК-лигаза фага T4 (КФ 6.5.1.1) с удельной активностью 5000 ед. акт./мл (НПО «Фермент», Вильнюс).

ДНК-зависимая РНК-полимераза (холофермент) (КФ 2.7.7.6), выделенная из клеток *E. coli* MRE-600, любезно предоставлена Р. Ш. Бибилашвили. Содержание σ -субъединицы в препарате не менее 95 %, удельная активность 1100 ед. акт./мг.

Дирибонуклеозидфосфаты rApU, rApA, rUpA, rCpA, rGpA, rCpG, rGpC, rUpC, rUpG и rUpU любезно предоставлены С. М. Женодаровой. Радиоактивность препаратов определяли на счетчике «Mark-II» («Nuclear Chicago», США).

Олигодезоксирибонуклеотиды CATTATAATG, GATTATAATC, CTTTATAAAG, CATTTAAATG, CAATATATTG, CATAATTATG получены химическим твердофазным фосфоамитидным методом синтеза на автоматическом синтезаторе «380A» («Applied Biosystems», США) [4]. После полного деблокирования олигонуклеотиды были очищены высокоэффективной жидкостной хроматографией с использованием колонки «Bondapak-C₁₈» (4,6×250 мм) на хроматографе «Waters» (США). Первичная структура синтезированных олигонуклеотидов подтверждена методом Максама — Гилберта [5].

5'-фосфорилирование декануклеотидов, введение в них ^{32}P -метки, лигирование декануклеотидов ДНК-лигазой фага T4 и выделение фракций полимеров длиной 100÷÷200 пар нуклеотидов осуществляли, как описано ранее [1, 2].

Транскрипция полинуклеотидов I—VI. Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 40 мМ трис-HCl, pH 7,9, 150 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,5 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ ЭДТА, 4·10⁻⁸ М синтетический дуплекс (средняя длина фрагментов ДНК принималась равной 150 парам нуклеотидов), 2·10⁻⁷ М РНК-полимеразу *E. coli*, инкубировали 10 мин. Затем добавляли 1 мкл смеси рибонуклеозидтрифосфатов до концентрации 0,1 мМ каждого, в том числе 0,1 мМ α - ^{32}P -rGTP (130 ГБк/ммоль). Через 15 мин инкубации при 37 °С транскрипцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ, смесь высушивали в вакууме, растворяли в 90 %-ном формамиде, содержащем красители-маркеры, и анализировали электрофорезом в 20 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Количественное соотношение транскриптов определяли измерением радиоактивности соответствующих участков гелей.

При проведении транскрипции в присутствии гепарина смесь полинуклеотида и РНК-полимеразы выдерживали в указанном выше буфере 10 мин, добавляли раствор гепарина (1 мкл) до конечной концентрации 100 мкг/мл и выдерживали эту смесь еще 15 мин. Транскрипцию инициировали, как описано выше, через 15 мин (37 °С) реакцию останавливали добавлением ЭДТА (до концентрации 20 мМ) и анализировали транскрипты вышеописанным способом.

Стимулируемую праймерами (гАрU, гАрА, гУрА, гСрА, гГрС, гСрС, гУрС, гУрG, гУрU, гГрА, грА и грG) транскрипцию проводили при 37 °С в 5 мкл того же буфера, содержащего четыре рибонуклеозидтрифосфата (2,5 мкМ каждого) и α -³²P-гGTP (175 кБк), соответствующий дуплексу ($4 \cdot 10^{-8}$ М) и праймеру (100 мкМ). Реакцию транскрипции инициировали добавлением РНК-полимеразы до конечной концентрации $2 \cdot 10^{-7}$ М. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением ЭДТА (до концентрации 20 мМ), и анализировали транскрипты электрофорезом в 20%-ном ПААГ, как описано ранее [3].

Изучение кинетики диссоциации комплексов полимеров I—VI с РНК-полимеразой *E. coli* на нитроцеллюлозных фильтрах проводили, как в работе [2]. Меченный изотопом ³²P дуплекс ($2 \cdot 10^{-9}$ М, 3,7 ТБк/ммоль) и РНК-полимеразу ($2 \cdot 10^{-8}$ М) инкубировали в 20 мкл буферного раствора, содержащего 40 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ ЭДТА, 50 мкг/мл альбумина, 100 мМ KCl, в течение 10 мин при 37 °С. Затем добавляли 2 мкл раствора гепарина до конечной концентрации 100 мкг/мл и через определенный промежуток времени смесь разбавляли 250 мкл буферного раствора того же состава, но не содержащего альбумина, и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры со скоростью 2 мл/мин. Радиоактивность, оставшуюся на фильтре, измеряли на сцинтилляционном счетчике по Черенкову. Во всех случаях фон радиоактивности, обусловленный задерживающейся на фильтре ДНК, составлял не более 4—5 % ее исходной величины.

Результаты и обсуждение. В качестве исходных соединений для получения полимеров I—VI были использованы соответственно следующие синтетические самокомплементарные декануклеотиды: рСАТТАТААТG (Ia), рГАТТАТААТC (IIa), рСТТТАТАААG (IIIa), рСАТТТАААТG (IVa), рСААТАТАТТG (Va), рСАТААТТАТG (VIa). Структура каждого из декануклеотидов IIa—VIa отличается от структуры декануклеотида Ia, содержащего «идеальную» последовательность Прибноу, одной из пяти возможных (без нарушения самокомплементарности) попарных перестановок двух нуклеотидов. Лигирование декануклеотидов Ia—VIa под действием ДНК-лигазы фага T4 проводили, как описано ранее [1], в присутствии терминаторов поликонденсации — соответствующих нефосфорилированных декануклеотидов — с тем, чтобы среди продуктов реакции преобладали полимеры со степенью поликонденсации $n=10 \div 20$. Это было необходимо для того, чтобы результаты проводимых исследований можно было сопоставить с полученными ранее для других ДНК-дуплексов [2]. Продукты реакции лигирования разделяли электрофорезом в 20%-ном ПААГ, и фракции полимеров нужной длины (рис. 1) элюировали с геля.

Для первичного обследования полученных полимеров мы прежде всего изучили комплексообразование их с РНК-полимеразой *E. coli*, а также транскрипцию *in vitro*. Стабильность комплексов с РНК-полимеразой, хотя и не имеет прямой связи с «силой» промоторов, тем не менее является важной характеристикой последних: подавляющее большинство сильных промоторов (в том числе *lacUV5*, *trp*, *lacI* и т. д.) образуют с ферментом чрезвычайно устойчивые двойные комплексы.

Кинетику диссоциации предварительно образованных комплексов полимеров I—VI с ферментом в присутствии гепарина исследовали методом фиксации комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах в условиях, ранее использованных нами для проведения аналогичных экспериментов [2, 6]. Результаты приведены на рис. 2. Видно, что все полимеры, за исключением III и IV, образуют комплексы по крайней мере двух типов: быстро распадающиеся и относительно долго живущие (кривые диссоциации имеют излом). Причем относительное содержание этих двух типов комплексов, а также значения периодов их

полураспада сильно варьируют (табл. 1). Как и следовало ожидать, значения параметров комплексов для полимера I совпадают с соответствующими значениями для полимера I' [2] (различия в структуре на концах полимеров несущественны). Сопоставляя структуру полимеров и стабильность их комплексов с ферментом, мы выявили следующую интересную закономерность: наиболее устойчивые комплексы фермент образует с полимерами I, II и V, т. е. когда изменения в структуре



полимеров затрагивают лишь «малоконсервативные» позиции (5-ю и 7-ю) в последовательности Прибноу (см. схему 1). В то же время, например, устранение только так называемого «инвариантного T» в 6-й позиции указанного гептануклеотида (полимер III) оказывает очень сильное воздействие на стабильность и характер образующихся комплексов, приводя к значительной лабилизации последних. Анало-

Рис. 1. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20 %-ном ПААГ продуктов поликонденсации под действием ДНК-лигазы фага T4 меченных изотопом ^{32}P олигонуклеотидов Ia (1); IIa (2); IIIa (3); IVa (4); Va (5); VIa (6). 0 — старт; XC — ксиленицианол; BPB — бромфеноловый синий. Стрелками указаны фракции полимеров, элюированные из геля для использования в дальнейших экспериментах

Fig. 1. Polyacrylamide gel (20 %) electrophoresis of the ligation products of ^{32}P -labelled oligonucleotides: Ia (1); IIa (2); IIIa (3); IVa (4); Va (5); VIa (6). 0 — start; XC — xylene cyanol; BPB — bromophenol blue. Arrows indicate the polymer fractions isolated from the gel and used in further experiments

гичный эффект наблюдается и в случае дуплекса IV (перестановка двух нуклеотидов в позициях 2 и 3).

При изучении матричной активности синтетических полинуклеотидов I—VI в реакции транскрипции *in vitro* в присутствии высокой кон-

Таблица 1

Параметры диссоциации комплексов синтетических двунуклеотидов с РНК-полимеразой *E. coli* в присутствии гепарина

Parameters of dissociation of *E. coli* RNA polymerase from synthetic DNA duplexes in the presence of heparin

Структура	Тип комплекса	Содержание в сумме комплексов, %	$t_{1/2}$, мин	$k_{\text{дис}}$, мин $^{-1}$
(pCATTATAATG) $_{(n=10 \div 20)}$ (I)	А	25	4	0,17
	Б	75	230	$3 \cdot 10^{-3}$
(pGATTATAATC) $_{(n=10 \div 20)}$ (II)	А	30	3	0,23
	Б	70	200	$3,46 \cdot 10^{-3}$
(pCTTTATAAAG) $_{(n=10 \div 20)}$ (III)	А	95	1	0,7
	Б	—	—	—
(pCATTTAAATG) $_{(n=10 \div 20)}$ (IV)	А	95	1—2	0,35—0,7
	Б	—	—	—
(pCAATATATTG) $_{n=10 \div 20}$ (V)	А	30	2	0,35
	Б	70	120	$6 \cdot 10^{-3}$
(pCATAATTATG) $_{(n=10 \div 20)}$ (VI)	А	65	2	0,35
	Б	35	50	$1,3 \cdot 10^{-2}$

центрации (100 мМ) рибонуклеозидтрифосфатов оказалось, что характер транскрипции в отсутствие и присутствии гепарина хорошо коррелирует с данными о стабильности комплексов с РНК-полимеразой (рис. 3). То есть общее количество транскриптов, получаемых после

Рис. 2. Кинетика диссоциации комплексов РНК-полимеразы с ДНК-дуплексами I (1); II (2); III (3); IV (4); V (5); VI (6). ДНК преинкубировали с РНК-полимеразой в течение 10 мин в стандартном буфере, содержащем 0,1 М КСl, при 37 °С. После добавления гепарина (100 мкг/мл) и инкубации в течение определенного промежутка времени смесь разбавляли и фильтровали. P_t — радиоактивность ДНК, задерживающейся на фильтре в момент времени t после добавления гепарина; P_0 — радиоактивность ДНК, задерживающейся на фильтре сразу после добавления гепарина

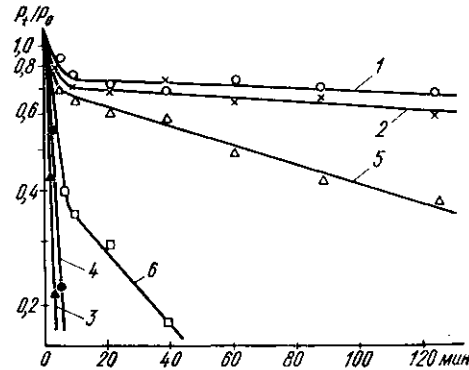


Fig. 2. Kinetics of *E. coli* RNA polymerase dissociation from DNA duplexes I (1); II (2); III (3); IV (4); V (5) and VI (6). DNA and RNA polymerases were preincubated for 10 min in standard buffer containing 0.1 M KCl, at 37 °C. After addition of heparin (100 μg/ml) and incubation for the period indicated the mixture was diluted and filtered. P_t — radioactivity of DNA bound to filter at time t after addition of heparin; P_0 — radioactivity of DNA bound to filter at zero time

15-минутной инкубации с ферментом, снижалось для всех дуплексов пропорционально снижению количества комплексов в реакционной смеси (рис. 2 и 3). Так, наибольшее количество транскриптов наблюдалось в случае дуплексов I, II и V: за указанное время оно снижалось соответственно на 10, 12 и 15 %. В то же время в случае полимеров III, IV и VI общее количество транскриптов уменьшается в 5—10 раз. Основываясь на полученных данных, вполне логично предположить, что РНК-полимераза образует, по крайней мере с полимерами I, II и V (возможно, также и VI), специфические комплексы, по структуре аналогичные «открытым» комплексам с природными промоторами. В таком случае можно было ожидать, что

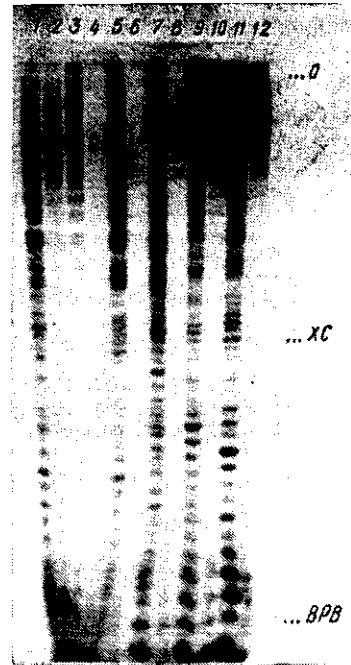
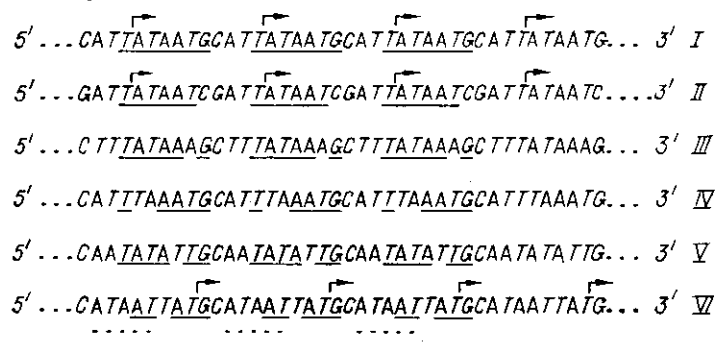


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20 %-ном ПААГ продуктов 15-минутной транскрипции при 37 °С полимеров I (1, 2); II (11, 12); III (5, 6); IV (7, 8); V (9, 10) и VI (3, 4) в отсутствие (1, 3, 5, 7, 9, 11) и в присутствии (2, 4, 6, 8, 10, 12) гепарина. Другие обозначения, как на рис. 1

Fig. 3. Polyacrylamide gel (20 %) electrophoresis of the 32 P-labelled RNA products synthesized on polymers I (1, 2); II (11, 12); III (5, 6); IV (7, 8); V (9, 10); VI (3, 4) for 15 min at 37 °C with (2, 4, 6, 8, 10, 12) or without (1, 3, 5, 7, 9, 11) heparin. The other designations are as in Fig. 1

транскрипция инициируется с определенных мест внутри этих полимеров. Мы попытались экспериментально установить такие места внутри всех полимеров I—VI. Для этого был использован известный из литературы подход [7], уже применявшийся нами для этих целей и позволяющий приблизительно оценить доминирующие места для инициации транскрипции [3]. Было проведено сравнительное исследование спо-

способности различных праймеров (дирибонуклеозидфосфатов и рибонуклеотидов, комплементарных матрице), добавленных в высокой концентрации (100 мМ), стимулировать инициацию транскрипции при низких концентрациях рибонуклеозидтрифосфатов. Известно, что для промоторов в этих условиях наибольшая стимуляция достигается в случае праймеров, комплементарных матрице вблизи естественной промотор-специфической точки инициации транскрипции [7]. Результаты экспериментов по стимуляции транскрипции праймерами приведены в табл. 2. Эти данные, а также неравномерность распределения интенсивности полос транскриптов в ПААГ позволили нам локализовать места преимущественной инициации синтеза РНК по крайней мере внутри полимеров I, II и VI (см. схему 2, где они указаны ломаными стрелками, и для примера рис. 4).



На схеме 2 подчеркнуты последовательности, гомологичные последовательности Прибну. Согласно данным литературы, иницирующий нуклеотид в природных промоторах обычно отстоит от последовательности Прибну на расстояние длиной в 3÷7 нуклеотидов [8]. И определенные нами расстояния от предполагаемых аналогов последовательности Прибну в полимерах I, II и VI до соответствующих преимущественных мест инициации транскрипции как раз попадают в этот диапазон. Причем интересно, что в случае полимеров I и II точки инициации совпадают. Отметим, что различия в соответствующих «последовательностях Прибну» наблюдаются только в наименее консервативной 7-й позиции. В случае полимера VI точка инициации расположена в

Таблица 2
Относительное увеличение уровня синтеза РНК на матрицах полимеров I—VI при использовании в качестве праймеров дирибонуклеозидфосфатов и рибонуклеотидов
The stimulation of RNA synthesis on the polymers I—VI by diribonucleosides and ribonucleotides primers

Полимер	rCpA	rApU	rUpU	rUpA	rApA	rUpG	rGpC
I	1,8	3,1	1,2	3,1	3,2	1,2	1,7
II	—	2,7	1,2	3,1	3,0	—	—
III	—	3,0	1,0	3,2	2,5	—	2,7
IV	1,0	1,0	1,1	1,2	1,0	1,0	1,2
V	1,0	1,0	1,0	0,9	1,2	1,0	1,0
VI	2,0	2,3	1,0	1,5	2,0	2,0	3,0

Полимер	rGpA	rUpC	rCpG	rCpU	rApG	rpA	rpG
I	—	—	—	—	—	2,0	1,4
II	0,9	1,2	1,0	—	—	1,2	1,0
III	—	—	—	2,8	2,5	2,0	2,5
IV	—	—	—	—	—	1,0	1,1
V	—	—	—	—	—	1,1	1,0
VI	—	—	—	—	—	1,0	1,4

другом месте. Это можно объяснить тем, что в полимере VI существуют еще как бы два варианта последовательности Прибноу (кроме «испорченной» ААТТАТГ), и, по-видимому, транскрипцию направляет одна из них, возможно, ТАТГСАТ.

Несколько неожиданные, с нашей точки зрения, результаты получены в случае полимера V: несмотря на то, что он образует стабильные транскрипционно активные комплексы с РНК-полимеразой, определить преимущественную точку инициации таким методом не удается.

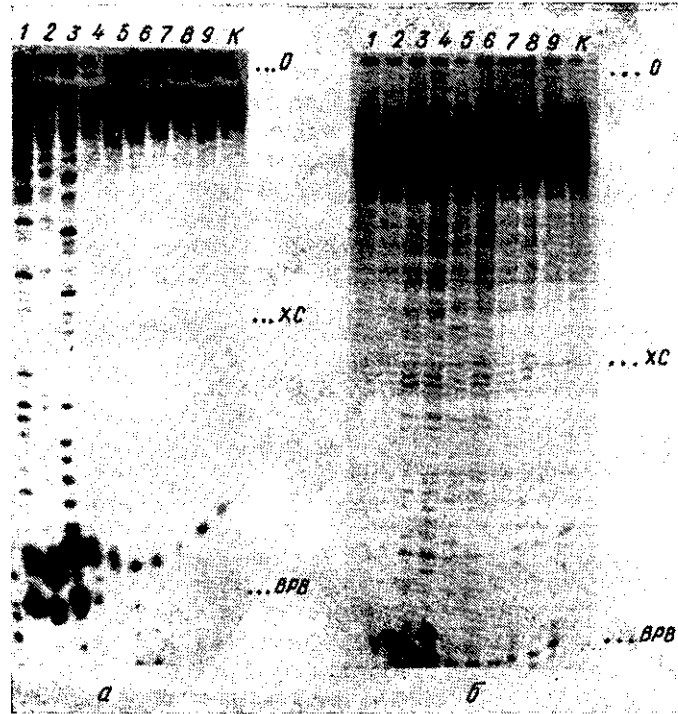


Рис. 4. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 20 %-ном ПААГ продуктов транскрипции полимеров II (а) и IV (б), стимулируемой праймерами: а—гАрU (1); гUpA (2); гАрA (3); гGrA (4); гUpC (5); гCpG (6); гUpU (7); гpA (8); гpG (9); б—гCpA (1); гApU (2); гUpA (3); гArA (4); гGrC (5); гUpU (6); гUpG (7); гpG (8); гpA (9). К—транскрипция без праймеров. Другие обозначения, как на рис. 1
Fig. 4. Polyacrylamide gel (20 %) electrophoresis of the ³²P-labelled transcripts synthesized on polymers II (a) and IV (b). Transcription was stimulated by primers: a—гApU (1); гUpA (2); гArA (3); гGrA (4); гUpC (5); гCpG (6); гUpU (7); гpA (8); гpG (9); б—гCpA (1); гApU (2); гUpA (3); гArA (4); гGrC (5); гUpU (6); гUpG (7); гpG (8); гpA (9). K—transcription without primers. The other designations are as in Fig. 1

Вероятно, это связано с тем, что в полимере V имеется последовательность TTGCAA, весьма сходная с «идеальной» последовательностью области —35-го нуклеотида в прокариотических промоторах, которая может оказывать дополнительное влияние как на комплексообразование, так и на характер транскрипции *in vitro*. Наблюдаемому явлению можно дать и другое объяснение: структура стабильных комплексов полимера V с РНК-полимеразой может отличаться от структуры комплексов фермента с природными промоторами, так что начало инициации синтеза РНК в таком полимере оказывается не строго фиксированным, несмотря на наличие почти идеальной последовательности Прибноу (замена в «малоконсервативной» 5-й позиции). Интересно отметить, что такой вариант регуляторного гептануклеотида (ТАТАТТГ) в природных промоторах ни разу не обнаружен, в то время как варианты, содержащиеся в полимерах I, II и даже VI, встречаются неоднократно в природных промоторах.

В настоящее время исследуется активность дуплексов I—VI в составе промотортестирующей плазмиды [3]. По предварительным дан-

ным, встраивание олигомеров декануклеотидов Ia, IIa и Va в участок ДНК, не содержащий промотора, приводит к появлению в этой области промоторной функции. В случае же декануклеотидов IIIa, IVa и VIa такого эффекта не наблюдается.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что полимеры I—VI сильно различаются по своим свойствам в системах, содержащих РНК-полимеразу *E. coli*, хотя нуклеотидный состав, периодичность повторов и элементов симметрии в этих полимерах идентичны. Это прямо подтверждает тот факт, что РНК-полимераза «небезразлична» к первичной структуре и «узнает» в полимерах I—VI совершенно определенную последовательность оснований. Из сопоставления структуры и изученных свойств полимеров I—VI следует, что таковой может быть последовательность ТАТА—Т—. На основании сравнительного анализа структуры природных и мутантных промоторов, а также некоторых экспериментальных данных в литературе высказывалось предположение [9, 10], что минимально необходимой (но, возможно, и недостаточной) для проявления промоторной функции структурой в ДНК является последовательность ТА— — —Т— (реже ГА— — —Т—). Наши выводы не противоречат этому предположению.

THE INTERACTION OF ESCHERICHIA COLI RNA POLYMERASE WITH DNA-DUPLEXES CONTAINING REPEATS.

THE INFLUENCE OF THE NUCLEOTIDES' SEQUENCE

O. N. Koroleva, V. L. Druza, Z. A. Shabarova

M. V. Lomonosov University, Moscow, USSR

Summary

The chemical-enzymatic synthesis of DNA-duplexes $d(pCATTATAATG)_n$ (I), $d(pGATTATAATC)_n$ (II), $d(pCTTTATAAAG)_n$ (III), $d(pCATTAAATG)_n$ (IV), $d(pCAATATATTG)_n$ (V), $d(pCATAATTATG)_n$ (VI) ($n=10\div 20$), containing repeats of the sequences completely and partially homologous to the «ideal» Pribnow box (TATAATG) has been carried out. The binding of *E. coli* RNA polymerase to synthetic DNA duplexes and *in vitro* transcription of these duplexes have been studied. It has been shown that duplexes I, II and V containing the sequence TATA-T form heparin-resistant transcriptionally active complexes with enzyme (the half life is $\sim 100-200$ min) while duplexes III and IV do not form stable complexes. The predominant *in vitro* transcription initiation sites were revealed within duplexes I, II and VI.

1. ДНК-подобные дуплексы, содержащие повторы. 7. Химико-ферментативный синтез полимеров с фрагментами природных промоторов / О. Н. Королева, В. Л. Друца, Н. Г. Долинная и др. // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 1.— С. 146—160.
2. Королева О. Н., Шабарова З. А., Бибилашвили Р. Ш. Взаимодействие РНК-полимеразы *E. coli* с ДНК-подобными дуплексами, содержащими повторы // Там же.— 1985.— 19, № 2.— С. 516—523.
3. Королева О. Н., Друца В. Л., Шабарова З. А. Транскрипция синтетических двуязычных полидезоксирибонуклеотидов с повторяющимися фрагментами промоторов // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 6.— С. 307—311.
4. Matteucci M. D., Caruthers M. H. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support // J. Amer. Chem. Soc.— 1981.— 103, N 11.— P. 3185—3191.
5. Maxam A. M., Gilbert W. Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages // Meth. Enzymol.— 1980.— 65.— P. 499—560.
6. Strauss H. S., Boston R. S., Thomas M. Variables affecting the selectivity and efficiency of retention of DNA fragments by *E. coli* RNA polymerase in the nitrocellulose filter-binding assay // Gene.— 1981.— 13, N 1.— P. 75—87.
7. Downey K. M., Jurmark B. S. Determination of nucleotide sequence at promoter regions by the use of dinucleotides // Biochemistry.— 1971.— 10, N 26.— P. 4970.
8. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. *E. coli* RNA polymerase interacts homologically with promoters // Cell.— 1980.— 20, N 2.— P. 269—281.
9. Molecular aspects of promoter function: an overview / P. H. von Hippel, D. G. Bear, R. B. Winter, O. G. Berg // Promoters: structure and function / Eds R. L. Rodriguez, M. J. Chamberlin.— New York: Praeger Publ., 1982.— P. 3—34.
10. Positive control of transcription initiation in *Escherichia coli* / T. Dairi, K. Inokuchi, T. Mizuno, S. Mizushima // J. Mol. Biol.— 1985.— 184, N 1.— P. 1— 6.

МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 23.07.86