



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 \* № 5 \* 1980

## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.07

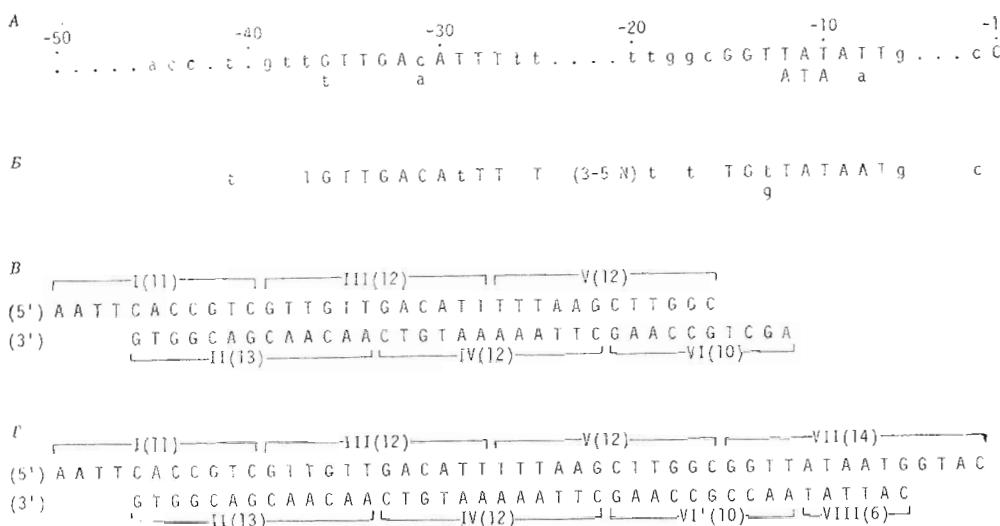
### ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ МОДЕЛЬНОГО ПРОМОТОРА ТРАНСКРИПЦИИ И УЧАСТКА УЗНАВАНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *Escherichia coli*

*Добрынина В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В.,  
Колосов М. Н.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

В 1978 г. Шерер и др. [1] высказали предположение, что должна существовать такая нуклеотидная последовательность, которая является «идеальным» промотором для РНК-полимеразы *E. coli*, и что все реальные промоторы представляют собой различные степени приближения к этому прототипу. На основании компьютерной обработки данных о структуре известных в то время участков инициации транскрипции в *E. coli* и колифагах они постулировали для этого промотора нуклеотидную последовательность, приведенную на рисунке А. Немного позднее аналогичную среднестатистическую модель промотора *E. coli* (рисунок Б) предложил Зибенлист [2]. При сравнении обеих моделей видно, что они имеют идентичную нуклеотидную последовательность —37—25 (участок узнавания РНК-полимеразы [3, 4]) и лишь незначительно различаются в области —15—6 (участок связывания РНК-полимеразы [3, 4]).

С целью экспериментальной проверки этой гипотезы мы предприняли химико-ферментативный синтез изображенных на рисунке двухцепочечных фрагментов ДНК (В) и (I'), первый из которых содержит предполагаемый участок специфического узнавания промотора РНК-полимеразой (но лишен участка связывания фермента), а второй охватывает всю инициаторную область от положения —50 до —2, т. е. представляет собой полный промотор транскрипции *E. coli*. Для этого нами были получены девять олигодезоксинауклеотидов (I) — (VIII) и (VI') длиной от гекса- до тетрадекамера; их синтез был выполнен фосфотриэфирным способом, как в работе [5], а структура и гомогенность доказаны методом нуклеотидных карт. Синтезированные олигонуклеотиды были сошты в двухцепочные ДНК с помощью ДНК-лигазы фага T4 в описанных ранее [5] условиях. При лигировании шестикомпонентного комплекса (I) · (<sup>33</sup>pII) · (<sup>33</sup>pIII) · (<sup>33</sup>pIV) · · (<sup>33</sup>pV) · (VI) образовался с выходом 60% 35-членный двухцепочный нуклеотид (В), который был выделен хроматографией на колонке с сефадексом G-50 и очищен электрофорезом в 15% полиакриламидном геле. Синтез 49-звинного нуклеотида (Г) проводили в три этапа: сначала попарно соединяли четыре олигонуклеотида левой части (I+<sup>33</sup>pIII) · (<sup>33</sup>pIV+<sup>33</sup>pII) и правой части (<sup>33</sup>pV+<sup>33</sup>pVII) · (VIII+<sup>33</sup>pVI), а затем продукты лигирования сошивали между собой. Оба синтезированных дуплекса, (В) и (Г), были



Нуклеотидная последовательность модельных промоторов *E. coli*. А и Б — гипотетические структуры, предложенные соответственно Шерером и др. [1] и Зибенлистом [2]; обозначение нуклеотида строчной буквой указывает на меньшую (по сравнению с прописной) вероятность его появления в данном положении. В и Г — фрагменты ДНК, синтезированные в настоящей работе. Римскими цифрами пронумерованы олигонуклеотиды, полученные химическим путем; в скобках указана их величина (число нуклеотидных звеньев)

разделены на комплементарные цепи электрофорезом в 18% денатурирующем поликариламидном геле, и строение четырех выделенных одноцепочечных нуклеотидов (49-членного, 41-членного и двух 35-членных) было доказано прямым определением их нуклеотидной последовательности с помощью модифицированного метода Максами — Гилберта [6, 7].

Таким образом, пами осуществлен химико-ферментативный синтез участка узнавания РНК-полимеразы и модельного промотора транскрипции *E. coli*. Последний точно соответствует «идеальной» нуклеотидной последовательности Шерера и др. (А), за исключением трансверсии в положении —8, в результате которой участку связывания РНК-полимеразы возвращена каноническая структура бокса Прибоу Т-А-Т-Р-А-Т-Г [8], имеющаяся в формуле Зибенлиста (Б) и побочном варианте формулы Шерера и др. (А, —8а). Оба синтезированных пами фрагмента ДНК, (В) и (Г), снабжены «липкими» концами для интеграции с вектором и транскрибуируемым геном, причем участки узнавания и связывания РНК-полимеразы flankированы сайтами разных эндонуклеаз рестрикции: *EcoRI*, *HindIII* и *KpnI*. Это позволяет, во-первых, избирательно вырезать из рекомбинантной ДНК весь искусственный промотор или любую его половину и, во-вторых, путем направленных мутаций *in vitro* (щебольших вставок, делеций и замещений) систематически изменять длину и структуру вариабельных участков перед точкой инициации транскрипции и между участками узнавания и связывания полимеразы, чтобы исследовать эффект этих модификаций на функциональную активность промотора *in vivo*.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Scherer G. E. F., Walkinshaw M. D., Arnott S. (1978) Nucl. Acids Res., 5, 3759–3773.
- Siebenlist U. (1979) Nucl. Acids Res., 6, 1895–1907.
- Gilbert W. (1976) in: RNA Polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds), pp. 193–205, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
- Reznikoff W. S., Abelson J. N. (1978) in: The Operon (Miller J. H., Reznikoff W. S., eds), pp. 221–243, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.
- Коробко В. Г., Добринин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов В. К., Колесов М. Н., Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Капелинская Т. В., Лисенков А. Ф., Дубинин Н. П. (1979) Биоорганическая химия, 5, 1802–1815.

6. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорганическая химия, 3, 1420–1422.
7. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. И. (1978) Биоорганическая химия, 4, 1281–1283.
8. Pribnow D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 784–788.

Поступило в редакцию  
4.II.1980

## THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF A MODEL PROMOTER AND A RECOGNITION SITE FOR RNA POLYMERASE OF *ESCHERICHIA COLI*

DOBRYNNIN V. N., KOROBKO V. G., SEVERTSOVA I. V., KOLOSOV M. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR*

Two DNA fragments *B* and *I'* have been synthesized to verify the Scherer et al.'s hypothesis [1] that the nucleotide sequence *A* is an ideal promoter for *E. coli* RNA polymerase. To this end, nine oligodeoxynucleotides (I—VIII, VI') were chemically prepared by the phosphotriester method and enzymatically joined into double-stranded DNAs by T4 DNA ligase. The one-step ligation of (I) and (VI) with 5'-phosphorylated derivatives (pII—pV) of the oligonucleotides (II—V) yielded the 35/35-membered DNA duplex *B*; the analogous joining of (I) and (VIII) with (pII—pIV) and (pV, pVI', pVII), respectively, followed by ligation of the reaction products resulted in the 49/41-membered duplex *I'*. The structures of the synthetic oligonucleotides (I—VIII, VI') were proved by fingerprinting, those of the DNA duplexes *B* and *I'* were determined by the modified Maxam-Gilbert techniques. As compared with the hypothetical sequence *A*, the DNA fragment *B* contains a putative recognition site for RNA polymerase while lacking its binding site, whereas the *I'* fragment comprises all but one (the –1st) nucleotides of the transcription initiation region *A*, thus being a model promoter for RNA polymerase of *E. coli*.