



УДК 547.962.32

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИНИЦИАЦИИ СИНТЕЗА РНК
И ПОЛИАДЕНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ
ESCHERICHIA COLI И ФАГА Т7

Патрушев Л. И., Бочарова Т. Н., Хесин Р. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемелина
Академии наук СССР, Москва;

Институт атомной энергии им. И. В. Курчатова, Москва

С помощью искусственных матриц показано, что РНК-полимераза фага Т7 может синтезировать poly(A) на более коротких олигодезокситимидиловых последовательностях, чем бактериальная. Увеличение размера матрицы за счет несчитываемых нуклеотидов резко повышает синтез poly(A) ферментом Т7. На нативной Т7-ДНК этот фермент в отличие от РНК-полимеразы *E. coli* инициирует синтез РНК только с GTP или с динуклеозидмонофосфатом (NpN), содержащим 3'-концевой G. На денатурированной Т7-ДНК образование poly(A) бактериальным и вирусным ферментами стимулируется всеми NpN с 3'-концевым A, а также ApG. Синтез poly(A) на (dT)₁₂ значительно повышается ApA, и замены в нем A на U или C понижают затравочную активность сильнее, чем замена на G, особенно в 3'-положении. С ферментом *E. coli* стимуляция синтеза poly(A) на (dT)₁₂ возрастает при удлинении олигорибоадениловой затравки, тогда как Т7-РНК-полимераза одинаково стимулируется ApA, ApApA и ApApApA, но присоединение C к 5'-концу с образованием CpApA или CpApApA частично снижает активность затравки для вирусного фермента. РНК-полимераза *E. coli* синтезирует, а вирусная не образует poly(U) на денатурированной ДНК.

Делается вывод, что внутри комплекса РНК-полимеразы и матрицы с последней взаимодействует минимум четыре нуклеотида 3'-конца строящейся РНК и ферменты менее эффективно элонгируют РНК-продукт, если в него ошибочно включен нуклеотид, некомплементарный матрице. На стадии инициации транскрипции РНК-полимераза фага Т7 специфичнее, чем бактериальная. Это сопоставляется с тем, что последняя в живых клетках синтезирует РНК, начиная с более разнообразных промоторов, чем фермент вируса.

Одним из ключевых моментов транскрипции является инициация синтеза цепей РНК на матричной ДНК. РНК-полимераза образует с матрицей инициационный («открытый») комплекс и выбирает индивидуальный нуклеотид матрицы, который определит первый 5'-концевой нуклеотид иницируемой цепи РНК. Этот выбор не обязательно однозначен даже на одном и том же промоторе, по крайней мере в случае РНК-полимеразы *E. coli* [1—3].

Такую неполную специфичность РНК-полимеразы бактерий при инициации синтеза РНК можно связать с тем, что этот фермент транскрибирует многочисленные опероны, промоторы которых различаются по последовательности нуклеотидов, включая непосредственно иницирующий [4—6].

Сокращения: poly(A) и poly(U) — соответственно полиадениловая и полиуридиловая кислоты; poly(dT) и oligo(dT) — соответственно поли- и олигодезокситимидиловые кислоты; NpN — динуклеозидмонофосфаты; NTP — рибонуклеозидтрифосфаты.

Если это объяснение правильно, то РНК-полимеразы, транскрибирующие лишь ограниченное число генов, могут отличаться от фермента *E. coli* большей специфичностью, т. е. точностью выбора инициаторного нуклеотида в матрице и соответственно нуклеотида, с которого начинается синтез РНК. Примером может служить РНК-полимераза, кодируемая геном фага Т7, которая, по-видимому, иницирует синтез РНК преимущественно на небольшом числе промоторов «поздних» генов вирусной хромосомы [7]. Поэтому мы исследовали точность выбора инициаторного нуклеотида РНК РНК-полимеразой фага Т7.

Наиболее простой моделью синтеза РНК является образование гомополимеров на соответствующих матрицах. «Скользкий» («рейтеративный») синтез полиадениловой кислоты (poly(A)) на тимидиловых последовательностях ДНК или на poly(dT) осуществляют РНК-полимеразы как бактерий [8—10], так и нечетных Т-фагов [11, 12]. Поэтому мы исследовали условия и точность инициации синтеза полирибонуклеотидов разными РНК-полимеразами не только при образовании РНК на ДНК, но и при синтезе poly(A) на искусственных матрицах.

Для начала синтеза РНК иницирующей нуклеозидтрифосфат (НТР) должен присутствовать в концентрации на порядок выше, чем остальные НТР, необходимые для дальнейшего наращивания цепей РНК [13, 14]. Олигорибонуклеотиды или даже динуклеозидмонофосфаты (NpN), содержащие первый 5'-концевой нуклеозид РНК-продукта, могут заменять инициаторный НТР и обеспечивают начало синтеза РНК при низкой концентрации всех НТР [15, 16]. Поэтому инициаторные нуклеотиды мы определяли по стимуляции начала транскрипции разными олигорибонуклеотидами или высокими концентрациями отдельных НТР. Сравнение активности затравок, различающихся по величине и составу, позволило не только определить инициаторные нуклеотиды, но и выяснить, какие требования предъявляют РНК-полимеразы к начальной последовательности РНК и какие замены нуклеотидов в инициаторном участке РНК допускают или подавляют дальнейший рост цепей РНК-продукта.

В то же время сравнение сложной, построенной из субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* и простого мономерного фермента фага Т7 представляет самостоятельный интерес, так как может выявить связь между особенностями структуры РНК-полимераз, с одной стороны, и механизмами и условиями инициации — с другой.

Таким образом, в работе сравнивали условия синтеза РНК и poly(A) РНК-полимеразами *E. coli* и фага Т7, обращая особое внимание на их требования по отношению к матрицам. Далее изучали точность выбора мест инициации синтеза полимеров, используя олигорибонуклеотидные затравки. Наконец, исследовали вопрос о связи между структурой последних и их активностью в качестве затравок. Результаты показали значительные различия между ферментами *E. coli* и фага Т7, проявляющиеся на стадии инициации синтеза цепей РНК.

Условия синтеза РНК и poly(A) РНК-полимеразами E. coli и фага Т7: влияние матричных ДНК, Mg²⁺ и Mn²⁺. РНК-полимераза, индуцируемая фагом Т7, отличается от бактериального фермента гораздо более высокой специфичностью по отношению к матричным ДНК: для синтеза РНК она активнее использует гомологичную, а не гетерологичные ДНК [11, 17, 18]. Мы исследовали, проявляется ли такая же специфичность Т7-РНК-полимеразы при «скользящем» синтезе гомополимера — poly(A) (см. табл. 1).

Полученные результаты показывают, что вирусный фермент действительно синтезирует РНК значительно активнее на гомологичной Т7-ДНК, как на нативной, так и на денатурированной, чем на чужеродной ДНК фага Т2, а РНК-полимераза *E. coli* одинаково использует обе ДНК. В отличие от этого не только фермент *E. coli*, но и РНК-полимераза фага Т7 активнее образует poly(A) на Т2-ДНК, чем на Т7-ДНК, т. е. при син-

Таблица 1

Синтез РНК и poly(A) РНК-полимеразами *E. coli* и фага Т7 на разных матрицах *

Опыт	Матрица	Ингибитор	Включение ³ H-АМР, имп/мин на пробу				
			Фермент <i>E. coli</i>		Фермент фага Т7		
			РНК	poly(A)	РНК	poly(A)	
1	Т7-ДНК нативная денатурированная Т2-ДНК нативная денатурированная (dT) ₁₂		26 339	175	3432	707	
			15 068	9641	1894	2393	
			26 125	5695	641	972	
			8704	22 032	435	4369	
			105 297		17 997		
2	Т7-ДНК нативная Т2-ДНК денатуриро- ванная	Нет Рифампицин ** КСI ***	30 831		1754		
			168		1275		
		Нет Рифампицин ** КСI ***		48 394		4694	
				607		3743	
		45 965		634			

* Инкубировали, как описано в «Экспериментальной части», в стандартной реакционной смеси, но с 3 мМ MnCl₂. При синтезе РНК добавляли ³H-АТР и нерадиоактивные GTP, CTP и UTP, а при синтезе poly(A) — только ³H-АТР. Концентрация (dT)₁₂ 12 мкМ.

** Добавлен рифампицин, конечная концентрация 50 мкг/мл.

*** Добавлен КСИ, конечная концентрация 0,2 М.

Таблица 2

Влияние размеров матричных олигонуклеотидов на синтез poly(A) РНК-полимеразами *E. coli* и фага Т7 *

Матрица	Включение ³ H-АМР (в процентах от включения на матрице денатур. Т2-ДНК)	
	Фермент <i>E. coli</i>	Фермент фага Т7
Т2-ДНК денатурированная (dT) ₃ (dT) ₆ (dT) ₉ (dT) ₁₂ (dT) ₁₅ d(pA-A-A-T-T-A-A-A) d(pA-A-A-T-T-A-A-A) **	100 (21 785 имп/мин)	100 (4894 имп/мин)
	0,4	3,5
	4,8	23
	20	103
	96	183
	132	>200
	0,3	36
0,3	6,7	

* Стандартная реакционная смесь. Концентрация олигонуклеотидов 12 мкМ.

** Добавлен UTR, конечная концентрация 0,5 мМ.

тезе poly(A) не проявляется специфичности к гомологичной ДНК. Денатурация матричной ДНК снижает синтез РНК и сильно стимулирует образование poly(A). Особенно хорошей матрицей для синтеза poly(A) является олиготимидиловая кислота — (dT)₁₂.

Известно, что в отличие от РНК-полимеразы *E. coli* фермент фага Т7 при синтезе РНК устойчив к рифампицину и, наоборот, чувствителен к повышению ионной силы [17]. Из данных табл. 1 видно, что эти различия между ферментами проявляются полностью и при «скользящем» синтезе poly(A). Однако препарат РНК-полимеразы фага Т7 синтезирует немного РНК на Т2-ДНК и несколько подавляется рифампицином. Это объясняется, вероятно, примесью бактериального фермента. Поэтому в дальнейшем во всех опытах к Т7-РНК-полимеразе добавляли рифампицин, чтобы полностью инактивировать фермент *E. coli*.

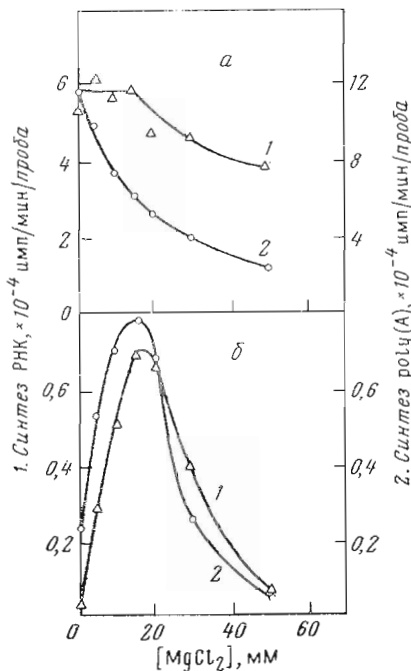


Рис. 1.

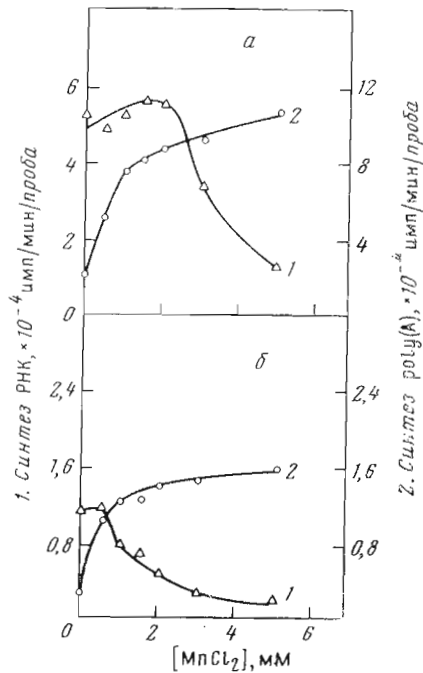


Рис. 2.

Рис. 1. Влияние ионов магния на синтез РНК и poly(A) РНК-полимеразами *E. coli* и фага Т7. Инкубировали, как описано в «Экспер. части», в присутствии 1 мМ $MnCl_2$ с нативной Т7-ДНК при синтезе РНК или с денатурированной Т2-ДНК при синтезе poly(A). Включение 3H -АМР. а — РНК-полимераза *E. coli* (полный фермент), б — РНК-полимераза фага Т7. 1 — синтез РНК; 2 — синтез poly(A)

Рис. 2. Влияние ионов марганца на синтез РНК и poly(A) РНК-полимеразами *E. coli* и фага Т7. Инкубировали, как описано в «Экспер. части», в присутствии 10 мМ $MgCl_2$ с нативной Т7-ДНК при синтезе РНК или с денатурированной Т2-ДНК при синтезе poly(A). Включение 3H -АМР. а — РНК-полимераза *E. coli* (полный фермент); б — РНК-полимераза фага Т7. 1 — синтез РНК; 2 — синтез poly(A)

Некоторые различия между ферментами выявляются и при исследовании влияния ионов магния и марганца. Из рис. 1 видно, что кривая зависимости синтеза РНК и poly(A) от концентрации Mg^{2+} на фоне постоянной концентрации Mn^{2+} имеет острый пик оптимума в случае Т7-РНК-полимеразы. В отличие от этого фермент *E. coli* наиболее активно синтезирует poly(A) без Mg^{2+} , в присутствии только Mn^{2+} . Синтез РНК на фоне постоянного содержания Mg^{2+} подавляется при повышении концентрации Mn^{2+} свыше 0,5 мМ в случае фермента фага Т7 и свыше 2 мМ для *E. coli* (см. рис. 2). Обе РНК-полимеразы усиливают образование poly(A) в отличие от РНК при повышении концентрации Mn^{2+} до 2—4 мМ. Известно, что ионы Mn^{2+} вообще побуждают РНК-полимеразы осуществлять разные «нефизиологические» реакции [19]. На основании такого рода данных для каждой из РНК-полимераз были выбраны оптимальные условия синтеза РНК и poly(A).

Влияние размера матрицы на синтез poly(A). Молекулы РНК-полимеразы *E. coli* значительно крупнее, чем молекулы фермента фага Т7, и поэтому при синтезе poly(A) могут различаться по способности использовать в качестве матрицы oligo(dT) разной длины. Данные, приведенные в табл. 2, подтверждают это предположение.

Действительно, фермент фага Т7 синтезирует немного poly(A) уже на (dT)₃. В противоположность этому РНК-полимераза *E. coli* образует заметное количество poly(A), начиная только с (dT)₆. Уровень синтеза poly(A) на денатурированной Т2-ДНК достигается РНК-полимеразой фага

T7 уже на 9-членном олигонуклеотиде, а *E. coli* — только на 12—15-членных $oligo(dT)$. Данные по бактериальному ферменту хорошо согласуются с результатами работы [20].

Это различие между ферментами может объясняться двумя причинами: либо для «скользящего» синтеза $poly(A)$ они нуждаются в тимидиловых последовательностях разной длины, либо из-за различной протяженности контактных областей ферментов для присоединения матриц последние должны иметь разные минимальные размеры. Поэтому мы исследовали синтез $poly(A)$ на нонануклеотиде $d(pA-A-A-T-T-T-A-A-A)$. Из данных табл. 2 видно, что увеличение общего размера матричного полинуклеотида без удлинения в нем тимидиловой последовательности не обеспечивает синтеза $poly(A)$ ферментом *E. coli*, но резко увеличивает образование $poly(A)$ РНК-полимеразой фага T7. По-видимому, эти ферменты значительно различаются по способности использовать для «скользящего» синтеза $poly(A)$ тимидиловые последовательности разной длины. Фермент *E. coli*, вероятно, недостаточно $(dT)_3$ независимо от общих размеров матрицы, в которую эта последовательность включена. В то же время данные по ферменту фага T7 показывают, что для синтеза $poly(A)$ РНК-полимеразам может быть важна не только протяженность последовательности тимидиловых остатков, но и общая длина матричного олигонуклеотида.

Седimentация poly(A), синтезируемой на $(dT)_{12}$. Мы судили о размерах $poly(A)$ -продукта, синтезируемого T7-РНК-полимеразой на $(dT)_{12}$, центрифугируя $poly(A)$ в градиенте концентрации глицерина в присутствии мочевины, додецилсульфата натрия или формальдегида для устранения возможной агрегации полинуклеотидов. $Poly(A)$ -продукты оказались весьма гетерогенными, содержащими как относительно небольшие, так и крупные цепи с константой седimentации до 23S — 25S, но кривая распределения имела четко выраженный пик в области 12S — 16S (рис. 3). Присутствие ApA-затравки (см. ниже) не повлияло на общее распределение полиаденилового продукта по длине. Это отличается от данных об увеличении размеров $poly(U)$, синтезируемого на $poly(A)$ РНК-полимеразой *E. coli*, при добавлении $(dT)_8$ -затравки [21].

В работе Нишимура и др. [22] приведены данные, согласно которым крупный полирибонуклеотид может образовываться на коротких (9-членных) олигодезоксирибонуклеотидных матрицах не путем «скользящего» («рейтеративного») синтеза, а благодаря последовательной подстановке в фермент «копец в конец» все новых и новых молекул матрицы. Аналогичную схему можно было бы представить и для олиготимидиловых матриц. Однако полученные нами результаты (см. табл. 2) не подтверждают этот механизм, по крайней мере для РНК-полимеразы фага T7: матричная активность $(dT)_3$ увеличивается, когда он находится в составе более длинного олигонуклеотида $d(pA-A-A-T-T-T-A-A-A)$. Более того, добавление УТР должно было бы стимулировать, а не подавлять, как это наблюдалось, включение меченого АМР на $d(pA-A-A-T-T-T-A-A-A)$, если бы пред-

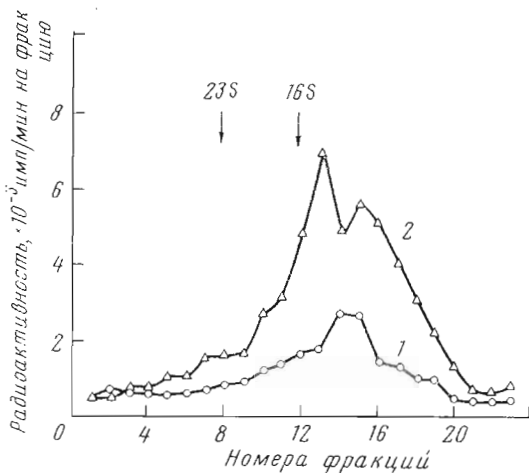


Рис. 3. Седimentация $poly(A)$, синтезированной РНК-полимеразой фага T7 на $(dT)_{12}$. Синтез $poly(A)$ и центрифугирование проводили, как описано в «Экспер. части». 1 — без ApA; 2 — с ApA

Влияние NTP и динуклеозидмонофосфатов на синтез РНК на матрице нативной Т7-ДНК РНК-полимеразой фага Т7 *

NTP или NpN	Включение ^3H -UMP (величина относительного синтеза РНК)	NTP или NpN	Включение ^3H -UMP (величина относительного синтеза РНК)
Нет	1,0 (1856 имп/мин)	GpG	4,9
АТР	2,2	GpU	1,2
GTP	46	GpC	0,8
CTP	1,8	UpA	0,9
АТР+GTP+CTP	81	UpG	3,7
ApA	1,1	UpU	0,8
ApG	8,3	UpC	0,8
ApU	0,7	SpG	4,1
ApC	0,8	SpU	0,9
SpA	0,9	SpC	0,9

* Стандартная реакционная смесь. Все пробы содержали АТР, GTP, CTP и ^3H -UTP (1,2 мкКи в пробе) в концентрации 10 мкМ, а также нативную Т7-ДНК (50 мкг/мл). Добавляли NTP (конечная концентрация 0,5 мМ) или NpN (0,2 мМ). Средние из двух опытов.

положение о последовательной подстановке матриц было правильным.

Влияние нуклеозидтрифосфатов (NTP) и динуклеозидмонофосфатов (NpN) на синтез РНК. Как уже отмечалось во введении, РНК-полимераза *E. coli* может начинать транскрипцию с разных нуклеотидов одного и того же промотора [4, 2]. Мы исследовали, всегда ли РНК-полимераза фага Т7 начинает цепи РНК с одного и того же NTP. Для этого определили, добавление какого NTP в высокой концентрации может обеспечить инициацию и рост цепей РНК на Т7-ДНК при низкой концентрации других NTP во время инкубации с вирусной РНК-полимеразой.

Результаты, приведенные в табл. 3, четко показывают, что интенсивную инициацию синтеза РНК на нативной Т7-ДНК обеспечивает только GTP. Этот результат согласуется с литературными данными [11, 23].

Известно, что олигорибонуклеотиды, комплементарные матрице, могут стимулировать инициацию синтеза цепей РНК при низкой концентрации всех NTP [15]. Активны даже динуклеозидмонофосфаты (NpN), которые избавляют фермент от необходимости образовывать первую фосфодиэфирную связь в начале РНК-продукта и оказываются затем ковалентно связанными на его 5'-конце [16]. Поэтому точность инициации транскрипции можно определить по способности РНК-полимеразы использовать разные олигорибонуклеотиды-затравки, с которых начинается синтез РНК.

В табл. 3 приведены результаты опытов по влиянию разных NpN на синтез РНК при инкубации РНК-полимеразы фага Т7 с Т7-ДНК и низкими концентрациями всех NTP. Из этих данных определенно следует, что активно стимулируют синтез РНК в указанных условиях только NpN, на 3'-конце которых находится гуанозин: ApG, GpG, SpG и UpG. Из них наиболее активен ApG; NpN с 5'-концевыми G (GpA, GpC и GpU) почти или совсем не стимулируют синтез РНК, так же как и все остальные NpN*. По нашему мнению, эти данные говорят об однозначности выбора инициаторных точек на Т7-ДНК РНК-полимеразой фага Т7: синтез РНК всегда должен начинаться только с G. Поскольку вслед за G в цепи РНК может быть другой нуклеотид, видно, что NpN стимулируют синтез, только если инициаторный G занимает в нем 3'-положение. Иначе говоря, РНК-полимераза фага Т7 может присоединять к NpN следующие нуклеотиды,

* Анализ разброса в параллельных пробах показал, что ошибка определений в этом и следующих опытах $\leq 10\%$. При инкубации РНК-полимераз с NpN без матрицы включение ^3H -UMP (или ^3H -AMP) не превышало фонового, поэтому соответствующие данные здесь и в следующих таблицах не приводятся.

комплементарные матрице, только начиная с 3'-ОН-группы гуанозина — истинного инициатора цепей РНК. Поэтому можно предполагать, что затравки-NpN не способны сместить точку инициации РНК даже на нуклеотиды, ближайšie к нормально иницирующей паре dC : dG матричной Т7-ДНК. В этом отношении РНК-полимераза фага Т7, вероятно, может отличаться от фермента *E. coli*, так как в случае последнего точка инициации смещается при добавлении NpN, комплементарных соседним участкам матрицы [1, 6, 24]. Однако до сих пор точно не установлена последовательность 5'-концевых нуклеотидов РНК, которые синтезирует на Т7-ДНК Т7-РНК-полимераза *in vivo* и *in vitro*.

Для обсуждения полученных данных нужно знать, обязательно ли полной должна быть комплементарность нуклеотидов затравки нуклеотидам матрицы, чтобы обеспечить инициацию синтеза РНК Т7-РНК-полимеразой. В отношении фермента *E. coli* известны случаи, когда инициацию РНК стимулируют NpN, в которых только один нуклеозид комплементарен матричному нуклеотиду (ср. [6, 27]). Этот вопрос можно исследовать наиболее точно на примере образования poly(A), когда заведомо известна последовательность и РНК-продукта, и матрицы.

Влияние динуклеозидмонофосфатов (NpN) на синтез poly(A). В табл. 4 приведены результаты сравнения затравочной активности NpN при синтезе poly(A) на денатурированной Т7-ДНК РНК-полимеразой *E. coli* и фага Т7. По стимуляции образования poly(A) динуклеозидмонофосфаты можно приблизительно расположить в следующие ряды:

фермент фага Т7: ApA > GpA > UpA ≥ ApG > CpA > UpU =
 = CpC = ApU = CpU ≥ CpG = UpG = ApC = UpC = 1 > GpC >
 > GpU > GpG;
 фермент *E. coli*: GpA > ApA > ApG > UpA > CpA ≥ CpG >
 > UpG > ApU = GpG ≥ CpU = UpC = 1 ≥ UpU = CpC = GpC >
 > GpU = ApC (знак > — предыдущий NpN активнее следующего,
 > — активнее или не отличается, = — не отличается, 1 — не стимулирует,
 1 > — подавляет или не влияет, 1 > — ингибирует).

Из этих данных видно, что ферменты несколько различаются по своей реакции на разные NpN. РНК-полимераза фага Т7 заметно стимулируется только NpN, содержащими на 3'-конце А, а также ApG, причем ApA особенно активен. Любопытно, что синтез poly(A) ингибируется GpG и, видимо, в меньшей степени GpU и GpC. Это можно объяснить повышенным сродством РНК-полимеразы фага Т7 к инициаторному гуанозину (см. выше). В результате этого фермент прочно связывает динуклеозидмонофосфаты, содержащие на 5'-конце G, с которых в отсутствие 3'-концевого А не начинается синтез poly(A). Далее видно, что гуанозин является единственным нуклеозидом, который может частично заменить 3'-концевой аденозин, но только в комбинации с 5'-аденозином (ApC). Другие замены в 3'-положении инактивируют затравку.

Фермент *E. coli* отличается от вирусного тем, что наиболее активно стимулируется GpA (ApA на втором месте), не подавляется GpG и несколько стимулируется 3'-G-содержащими NpN. Создается впечатление, что бактериальный фермент легче допускает замены аденина на гуанин, чем вирусный, и в результате стимулируется большим набором NpN. Во всех случаях цепи poly(A) могут начинаться присоединением АМР только к 3'-концевым А или G, но не к 3'-концевому U или C затравки.

Связь затравочной активности NpN с их комплементарностью матрице исследовали далее при образовании poly(A) на (dT)₁₂ РНК-полимеразой фага Т7 (см. табл. 5). Как и на денатурированной Т7-ДНК, на (dT)₁₂ сильнее всего синтез poly(A) стимулирует ApA, полностью комплементарный матрице. Замена 5'-концевого А на другие нуклеозиды понижает активность затравки. При этом замена 5'-концевого А на G сказывается мало, а замены на U или C — сильно, но некоторая способность повышать синтез poly(A) у UpA и CpA сохраняется. Замены 3'-концевого А в ApA

Влияние динуклеозидмонофосфатов на синтез poly(A) на матрице денатурированной T7-ДНК РНК-полимеразами *E. coli* и фага T7 *

NpN или NTP	Включение ³ H-АМР (величина относительного синтеза poly(A))		NpN или NTP	Включение ³ H-АМР (величина относительного синтеза poly(A))	
	Фермент <i>E. coli</i> полный	Фермент фага T7		Фермент <i>E. coli</i> полный	Фермент фага T7
Нет	1,0 (1823 имп/мин)	1,0 (749 имп/мин)	UpA	2,0	2,4
ApA	4,1	5,6	UpG	1,3	1,0
ApG	3,2	2,1	UpU	0,9	1,1
ApU	1,1	1,1	UpC	1,0	1,0
ApC	0,8	1,0	SpA	1,6	1,6
GpA	5,3	3,9	SpG	1,5	1,0
GpG	1,1	0,5	SpU	1,0	1,1
GpU	0,8	0,7	SpC	0,9	1,1
GpC	0,9	0,9	GTP+UTP+CTP	2,5	2,3
			Нет **	6,0	2,8

* Стандартная реакционная смесь. Все пробы содержали денатурированную T7-ДНК в концентрации 50 мкг/мл. Добавляли NpN (конечная концентрация 0,2 мМ) или GTP, UTP и CTP (0,5 мМ).

** Добавлен $MnCl_2$, конечная концентрация 3 мМ.

Таблица 5

Влияние динуклеозидмонофосфатов на синтез poly(A) на матрице (dT)₁₂ РНК-полимеразой фага T7 *

NpN	Включение ³ H-АМР (величина относительного синтеза poly(A))
Нет	1,0 (3811 имп/мин)
ApA	5,8
ApG	2,2
ApC	1,1
GpA	5,1
GpC	1,3
UpA	2,0
SpA	1,9

* Стандартная реакционная смесь. Все пробы содержали (dT)₁₂ в концентрации 12 мкМ. Добавляли NpN (конечная концентрация 0,16 мМ).

на другие нуклеозиды резко снижает активность NpN в качестве затравки. Заметная, хотя и небольшая, активность сохраняется только при замене 3'-концевого А на G.

Таким образом, для максимальной активности в качестве затравки NpN должен быть полностью комплементарен матрице. Однако замены на разные некомплементарные нуклеотиды не однозначны по своему эффекту: слабее всего влияет замена пурина А на пурин G, особенно в 5'-положении, сильнее — на пиримидины С и U.

В этих опытах мы исследовали короткие — всего лишь двучленные олигонуклеотиды — затравки. Поэтому возникают два вопроса: как влияет длина затравки на ее активность и как сказываются замены нуклеотидов в более длинных олигонуклеотидных затравках?

Влияние размеров и состава олигонуклеотидов на их активность в качестве затравок при синтезе poly(A). Мы сравнили влияние длины и состава олигонуклеотидов, используемых в качестве затравок, на синтез poly(A) на (dT)₁₂ РНК-полимеразами *E. coli* и фага T7. Известно, что не только пол-

Таблица 6

Влияние разных затравок на синтез poly(A) на матрице (dT)₁₂ РНК-полимеразами *E. coli* и фага T7*

Олигонуклеотиды	Включение ³ H-АМР (величина относительного синтеза poly(A))		
	Фермент <i>E. coli</i> , полный	Фермент <i>E. coli</i> , минимальный	Фермент фага T7
Нет	1,0 (16 928 имп/мин)	1,0 (3071 имп/мин)	1,0 (1434 имп/мин)
ArA	2,5	7,8	4,8
ArArA	3,3	31,0	5,0
ArArArA	5,2	41,4	4,5
CrA	1,5	5,7	1,3
CrArA	2,8	10,8	2,2
CrArArA	—	42,3	3,7
ArC	0,7	1,3	0,7
ArArC	1,3	5,4	1,2
ArCrA	1,2	3,6	1,3
CrCrA	0,8	1,2	0,7

* Стандартная реакционная смесь. Все пробы содержали (dT)₁₂ в концентрации 12 мкМ. Добавляли олигонуклеотиды, конечная концентрация 80 мкМ.

Таблица 7

Синтез poly(U) на матрице денатурированной T2-ДНК РНК-полимеразами *E. coli* и фага T7*

Условия синтеза		Включение ³ H-УМР		
ДНК	NpN или NTP	Фермент <i>E. coli</i> , полный		Фермент фага T7, имп/мин на пробу
		имп/мин на пробу	величина относит. синтеза	
Денатур. T2-ДНК	Нет	1110	1,0	65**
»	ArA	1353	1,2	85
»	ArU	2315	2,1	84
»	CrU	1628	1,5	61
»	CrC	810	0,7	91
»	UrU	5087	4,6	98
»	CrU	2044	1,8	74
»	CrC	1196	1,1	105
»***	Нет	16 921	15	116
Нативная T7-ДНК	АТР+GТР+СТР	47 747	43	15 475
Нет	UrU	222	0,2	—

* Стандартная реакционная смесь. Все пробы содержали ³H-УТР в концентрации 0,2 мМ (120 мкКи/ммоль) и, где указано, 50 мкг/мл ДНК. Добавляли NpN (конечная концентрация 0,2 мМ), АТР, GТР, СТР (0,5 мМ).

** В пробе без инкубации включение ³H-УТР составляло 95 имп/мин.

*** Добавлен MnCl₂, конечная концентрация 3 мМ.

ная РНК-полимераза *E. coli*, содержащая сигма-фактор, но и «минимальный» (core) фермент активно синтезирует poly(A) на (dT)₁₂ [26]. Однако образование РНК этими ферментами, по крайней мере на нативной T2-ДНК, по-разному стимулируется различными NpN [27]. Поэтому мы исследовали влияние олигонуклеотидов на обе формы РНК-полимеразы *E. coli* и на фермент фага T7 (см. табл. 6).

По стимулирующему влиянию на разные РНК-полимеразы при синтезе poly(A) на (dT)₁₂ исследованные олигонуклеотидные затравки можно приблизительно расположить в следующие ряды:

фермент фага T7: ArA ≤ ArArA ≥ ArArArA > CrArArA > CrArA > CrA = ArCrA ≥ ArArC > 1 > ArC = CrCrA;

минимальный фермент *E. coli*: $ArArArA = CrArArA > ArArA \gg$
 $\gg CrArA > ArA > CrA \gg ArArC > ArCrA > ArC = CrCrA \gg 1$;
 полный фермент *E. coli*: $ArArArA > ArArA > CrArA \gg ArA >$
 $> CrA \gg ArArC \gg ArCrA > 1 > CrCrA \gg ArC$.

Видна большая разница между РНК-полимеразами фага Т7 и *E. coli*: вирусный фермент одинаково стимулируется ди-, три- и тетраденилатами, тогда как увеличение размера oligo(A)-затравки значительно усиливает стимуляцию синтеза poly(A) РНК-полимеразами бактерий — как минимальным, так и полным ферментом. Далее, замены А на С в любом положении снижают активность затравки при работе Т7-РНК-полимеразы, причем замена на 3'-конце сказывается сильнее, чем на 5'. Интересно, что активность ArA и ArArA понижается присоединением С к 5'-концу с образованием CrArA и CrArArA соответственно. В случае фермента *E. coli* замены А на С также понижают активность затравки, но только если заменяемый нуклеотид находится не далее чем в 3-м положении от 3'-конца ($CrArA < ArArA$, но $CrArArA = ArArArA$). В отличие от РНК-полимеразы фага Т7 при работе фермента *E. coli* присоединение дополнительного С к 5'-концу oligo(A) не только не понижает, а, возможно, даже несколько повышает его затравочную активность ($CrArA \gg ArA$, $CrArArA \gg ArArA$). Присоединение комплементарного нуклеотида А с 5'-стороны от некомплементарного частично компенсирует его отрицательное действие: например, ArArC несколько стимулирует синтез poly(A) всеми ферментами, тогда как ArC неактивен.

Таким образом, РНК-полимеразы *E. coli* и фага Т7 различаются как по способности использовать нуклеотидные затравки разной длины, так и по реакции на замены нуклеозидов, комплементарных матрице, на некомплементарные.

Синтез полиуридиловой кислоты (poly(U)). Сравнение РНК-полимераз *E. coli* и фага Т7 было продолжено в опытах по синтезу другого гомополимера — poly(U) на денатурированной Т2-ДНК, на которой оба фермента активно образуют poly(A). Из данных табл. 7 видно, что РНК-полимераза *E. coli* (полный фермент) синтезирует poly(U) особенно интенсивно в присутствии Mn^{2+} . Без Mn^{2+} синтез poly(U) в 15 раз слабее, но несколько стимулируется NpN , имеющими 3'-концевой U. Наиболее активен UrU . Исследованные NpN с А или С в 3'-положении образование poly(U) практически не стимулируют.

В отличие от РНК-полимеразы *E. coli* фермент фага Т7 не синтезирует сколько-нибудь заметных количеств poly(U) на денатурированной Т2-ДНК даже при добавлении Mn^{2+} или NpN , хотя тот же фермент на той же ДНК активно образует poly(A). Вероятно, неактивность РНК-полимеразы фага Т7 в отношении синтеза poly(U) нельзя объяснить тем, что она не может инициировать цепи этого гомополимера: синтеза poly(U) не наблюдается и при добавлении NpN , в том числе тех, которые стимулируют образование poly(U) РНК-полимеразой *E. coli*. Скорее всего, фермент фага Т7 почему-то не может осуществлять «скользящий» синтез poly(U) на олигодениловых последовательностях денатурированной ДНК. Вопрос требует дальнейшего изучения с использованием других матриц, в частности oligo- и poly(dA).

Специфичность инициации транскрипции проявляется на нескольких этапах действия РНК-полимеразы: при выборе участка матричной ДНК (промотора), индивидуального инициаторного нуклеотида матрицы и NTP среды, наконец, при дальнейшем присоединении NMP, эффективность которого зависит от того, полностью ли комплементарно матрице новообразованное 5'-начало РНК. Наши результаты позволяют сравнить точность осуществления этих процессов двумя РНК-полимеразами — фага Т7 и *E. coli*.

В соответствии с литературными данными [14, 17, 18] полученные результаты (см. табл. 1) показали, что вирусный фермент значительно

активнее синтезирует РНК на нативной или денатурированной гомологичной Т7-ДНК, чем на чужеродной Т2-ДНК, тогда как РНК-полимераза *E. coli* транскрибирует эти ДНК примерно одинаково. Однако оба фермента образуют poly(A) значительно активнее на Т2-ДНК, чем на Т7-ДНК. Интересно, что РНК-полимераза *E. coli* синтезирует poly(A) на нативной Т2-ДНК и совершенно не образует poly(A) на нативной Т7-ДНК. Это нельзя объяснить отсутствием в Т7-ДНК подходящих олиготимидиловых последовательностей, так как на денатурированной Т7-ДНК бактериальный фермент активно синтезирует poly(A). РНК-полимераза фага Т7 образует poly(A) на обеих нативных ДНК.

Из этого следует, что РНК-полимераза фага Т7, как и *E. coli*, достаточно точно выбирает участки ДНК для транскрипции только в оптимальных условиях: при денатурации ДНК или в присутствии лишь одного АТР вирусный фермент инициирует транскрипцию на необычных местах матрицы. Но и на нативной Т7-ДНК РНК-полимераза фага Т7 может синтезировать РНК *in vivo* и *in vitro* не только на «поздних» генах, но и на других участках — на «ранних» генах вирусной хромосомы [28—30]. Таким образом, нельзя говорить о принципиальной разнице между двумя РНК-полимеразами в отношении точности выбора промоторов.

Однако сравниваемые ферменты различаются по способности использовать матрицы разных размеров: бактериальная РНК-полимераза требует для синтеза poly(A) более крупных oligo(dT) в качестве матриц ($\geq (dT)_6$), чем вирусная ($\geq (dT)_3$) (см. табл. 2). Синтез poly(A) ферментом фага Т7 резко повышается при замене $(dT)_3$ на $d(pA-A-A-T-T-T-A-A-A)$, а бактериальный фермент не образует poly(A) и на этой матрице. Можно заключить, что для оптимального расположения на участке Т7-РНК-полимеразы, связывающем матрицу, последняя должна состоять более чем из трех нуклеотидов, хотя последовательности из трех тимидиловых остатков достаточно для «скользящего» синтеза poly(A). Для активной транскрипции важна не только длина непосредственно считываемого участка, но и общая длина матрицы. В отличие от вирусного фермента *E. coli* для синтеза poly(A) недостаточно последовательности из трех тимидинов. Эти данные не противоречат литературным [31], согласно которым РНК-полимеразе *M. luteus* для образования poly(A) на poly(rUX) необходимы последовательности минимум из двух уридиловых остатков. Нишимура и др. [22] показали, что фермент *E. coli* не образует poly(A) на $(dT-T-C)_1$ и $(dT-T-C)_2$, но синтезирует некоторое количество poly(A) на $(dT-T-C)_3$; из этого видно, что для образования poly(A) необходима последовательность из нескольких тимидиловых остатков, но расположенный между ними остаток С может «выпепляться».

Прикрепившись к промотору, РНК-полимераза, вероятно, выбирает непосредственную точку инициации синтеза РНК — индивидуальный нуклеотид матрицы. Из литературы известно, что фермент *E. coli* может инициировать синтез РНК на разных промоторах одних и тех же вирусных ДНК или даже внутри одного промотора бактериального оперона как с АТР, так и с ГТР [2, 24, 32—36]. Понижение концентрации инициаторного NTP при повышении содержания другого NTP в среде, а также добавление некоторых NpN в качестве затравок может сдвигать начало построения цепи РНК в сторону от истинного инициаторного нуклеотида матрицы (ср. [1, 24] с [6, 25]). По-видимому, точка инициации цепей РНК бактериальным ферментом внутри промотора не обязательно абсолютно фиксирована [3]. Кстати, и от «прибновского ящика» — универсальной нуклеотидной последовательности промоторов — точка инициации РНК может находиться на разных расстояниях — от 4 до 7 нуклеотидов [5].

В то же время РНК-полимераза фага Т7 инициирует синтез РНК на нативной Т7-ДНК только с ГТР ([11, 23], а также табл. 3). При низкой концентрации NTP синтез РНК стимулируют из всех 16 возможных NpN

только те, у которых в 3'-положении находится гуанозин (см. табл. 3). По-видимому, ни высокие концентрации разных NTP, ни NpN-затравки не могут сдвинуть точку инициации синтеза РНК вирусной РНК-полимеразой на точкой Т7-ДНК. Можно предполагать, что фермент фага Т7 выбирает точку начала транскрипции внутри промотора, а также первый NTP РНК более строго, чем РНК-полимераза *E. coli*.

Денатурация ДНК нарушает специфичность взаимодействия с вирусным ферментом: он начинает иницировать цепи РНК не только с GTP, но и с ATP [12, 37]. Денатурация ДНК также сильно облегчает образование poly(A) из ATP, которое стимулируется NpN с 3'-концевым А (см. табл. 4).

Можно предполагать, что специфичность и точность транскрипции обеспечивается не только выбором места инициации РНК и первого NTP, но также «узнаванием» или «проверкой» ферментом правильности новообразованного участка РНК-продукта — степени его комплементарности матрице. Считается, что 3'-конец РНК удерживается специальным центром молекулы РНК-полимеразы [3]. В связи с этим возникает вопрос: какова величина 3'-концевого участка РНК, взаимодействующего с ферментом и матрицей, и как влияет степень комплементарности этого участка матрицы на дальнейший рост цепи РНК? Вопрос был исследован с помощью олигонуклеотидов-затравок при «скользящем» синтезе poly(A) на (dT)₁₂, исходя из того, что затравки имитируют 3'-концы строящейся цепи РНК.

По способности стимулировать синтез poly(A) на (dT)₁₂ РНК-полимеразой фага Т7 изученные NpN расположились в следующий ряд (см. табл. 5): ApA > GrA ≫ ApG ≧ UrA ≧ CrA > GrC ≧ ApC ≧ 1. Видно, что максимально активен ApA, полностью комплементарный матрице. Замены в 5'-положении сказываются слабее, чем в 3', и разные основания не однозначны по своему влиянию: меньше сказываются замены пурина А на пурин G и сильнее на пиримидины С или U. Это согласуется и с данными табл. 4 о синтезе poly(A) на денатурированной Т7-ДНК.

Наблюдаемая картина напоминает неоднозначность спаривания нуклеотидов при трансляции (гипотеза «люфта» [38, 39] и репликации ДНК [40]). Как видно, «люфт» может наблюдаться и при транскрипции. Poly(G) образуется на (dT — C)_n · (dG — A)_n, но не синтезируется на (dT — G)_n · (dC — A)_n [41]. GMP включается чаще, чем CMP, при «ошибках» во время синтеза poly(A) на (dT)₁₂ или на poly(U), осуществляемого РНК-полимеразой *E. coli* в присутствии ATP вместе с GTP или CTP [26, 42]. Правда, обратная картина обнаружена при транскрипции poly(dA — T) · poly(dA — T) [43].

Итак, даже если NpN, имитирующий 3'-конец растущей цепи РНК, не полностью комплементарен матрице, он все-таки может удерживаться в ферменте и служить акцептором при присоединении следующего нуклеотида, хотя, как правило, менее эффективно, чем комплементарный NpN. При увеличении длины oligo(A)-затравки повышается синтез poly(A), осуществляемый на (dT)₁₂ полным и особенно минимальным ферментом *E. coli* (лишенным сигма-фактора) (см. табл. 6). В противоположность этому синтез poly(A) РНК-полимеразой фага Т7 одинаково стимулируется ApA, ApApA и ApApApA. Таким образом, для максимального синтеза poly(A) бактериальный фермент нуждается в более длинной затравке, чем вирусный. Это можно сопоставить с тем, что последний способен синтезировать poly(A) на более коротких олиготимидиловых последовательностях, чем РНК-полимераза *E. coli* (см. табл. 2).

Однако и в случае вирусного фермента в тройном комплексе с матрицей взаимодействует не менее трех или даже четырех нуклеотидов 3'-конца затравки или РНК-продукта. Это видно из того, что CrApA и CrApApA менее активны в качестве затравок, чем соответственно ApApA и ApApApA. Следует подчеркнуть, что для максимальной активности зат-

равки важно не присутствие дополнительного 3-го и 4-го нуклеотидов, комплементарных матрице, а *отсутствие* в этих положениях некомплементарных нуклеотидов: по своей активности $\text{CpApA} < \text{ApA}$, $\text{CpApApA} < \text{ApApA}$ и $\text{CpCpA} < \text{CpA}$ при синтезе poly(A) на $(\text{dT})_{12}$ РНК-полимеразой фага T7. Создается впечатление, что фермент как бы проверяет РНК-продукт на отсутствие ошибочно включенных нуклеотидов и в их присутствии менее эффективно его элонгирует. Можно было бы предположить, что олигонуклеотиды, не полностью комплементарные матрице, просто не входят в состав тройного комплекса. Однако из данных табл. 6 видно, что ApC и CpCpA подавляют синтез poly(A) на $(\text{dT})_{12}$, т. е. несомненно взаимодействуют с ферментом и в присутствии матрицы.

По реакции на различные олигонуклеотидные затравки РНК-полимеразы *E. coli* несколько отличается от вирусного фермента: по своей активности $\text{CpApA} < \text{ApApA}$, $\text{CpCpA} < \text{CpA}$, но $\text{CpApApA} = \text{ApApApA}$, а $\text{CpApA} > \text{ApA}$ и $\text{CpApApA} > \text{ApApA}$. Присоединение дополнительного комплементарного нуклеотида к 5'-концу компенсирует отрицательный эффект 3'-концевого некомплементарного основания: $\text{ApApC} > \text{ApC}$. Можно заключить, что по сравнению с ферментом фага T7 РНК-полимеразы *E. coli* менее строго выбраковывает неправильные затравки, которые, как мы считаем, имитируют 3'-концевые участки РНК-продукта. Вероятно, это объясняется тем, что увеличение размера затравки повышает ее эффективность в случае бактериального фермента и тем самым компенсирует отрицательное влияние дополнительного некомплементарного нуклеотида, расположенного на 5'-конце затравки. Поэтому можно предполагать, что в молекуле РНК-полимеразы бактерий затравка (и соответственно 3'-конец РНК-продукта) удерживается одновременно двумя системами связей. Во-первых, олигонуклеотид спаривается с матрицей комплементарными ей основаниями, а некомплементарные этому мешают [44]. Во-вторых, тот же олигонуклеотид присоединен к каким-то группам белка, причем прочность этой связи зависит не от комплементарности нуклеотидов матрице, а от их числа, т. е. от длины затравки.

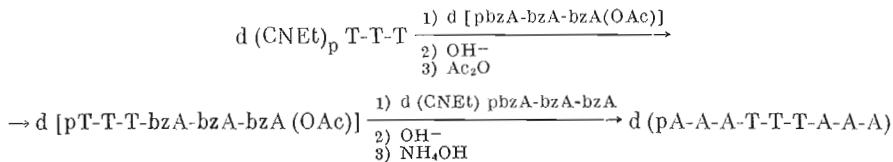
Бактериальный и вирусный ферменты резко различаются и по способности к синтезу другого гомополимера — poly(U) (см. табл. 7). Эти результаты еще раз подчеркивают, что вирусный фермент сильнее ограничен в выборе участков ДНК для транскрипции, чем бактериальный.

На основании всей совокупности данных можно заключить, что вирусная РНК-полимераза выбирает более специфично, чем бактериальная, матрицу для транскрипции, инициаторный нуклеотид в ней, NTP для начала построения РНК, а также олигонуклеотид-затравку (т. е. более строго проверяет комплементарность матрице новообразованного 3'-конца РНК-продукта). Большую специфичность, однозначность работы вирусного фермента по сравнению с бактериальным можно объяснить тем, что последний приспособлен к транскрипции разнообразных оперонов, различающихся по первичной структуре промоторов. Выбор последних зависит от действия на фермент ряда белков-регуляторов. В противоположность этому РНК-полимеразы фага T7 предназначена для инициации синтеза РНК только на немногочисленных промоторах «поздних» генов вирусной хромосомы (к сожалению, их структура еще не известна). До сих пор не обнаружено белковых факторов, которые влияли бы на специфичность выбора этим мономерным ферментом мест инициации транскрипции. Поэтому бактериальная РНК-полимераза может быть функционально и структурно более лабильной и «поливалентной» по отношению к матрице и продукту, чем вирусная.

Экспериментальная часть

Немеченные NTP фирмы «Reanal» $^3\text{H-ATP}$ и $^3\text{H-UTP}$ приготовлены Н. Ф. Мясоедовым с сотр. Динуклеозидмонофосфаты получены от М. Грюнберг-Маного и из фирмы «Sigma», $(\text{dT})_{12}$ — от Ю. А. Берлина, другие

oligo(dT) — от З. А. Шабаровой. Синтез d(pA-A-A-T-T-T-A-A-A) осуществлен нами фосфодиэфирным методом [45] по схеме:



В работе использовали обычные защитные группы и методы их снятия. Селективное дезацетилирование на стадии получения тринуклеотида тимидиловой кислоты проводили с помощью жидкого аммиака [46]. Дезоксирибонуклеотид очищали на DEAE-целлюлозе и идентифицировали анионообменной хроматографией, спектрофотометрически и по данным полного экзонуклеазного гидролиза.

Три- и тетра-нуклеотиды были синтезированы С. М. Женодаровой с сопр. последовательным действием рибонуклеаз различной специфичности и полинуклеотидфосфорилазы [47—49]. ДНК из фагов Т2 и Т7 выделяли стандартным фенольным методом [50] и, где указано, денатурировали нагреванием.

РНК-полимераза E. coli получена из клеток штамма В по прописи [8] с дополнительной очисткой центрифугированием в градиенте глицерина [51]. Минимальный фермент и сигма-фактор разделяли на фосфоцеллюлозе [51].

РНК-полимераза фага Т7 получена из биомасс через 10 мин после заражения *E. coli* В диким фагом Т7 [52]. Т7-РНК-полимеразу выделяли по незначительно модифицированному методу с очисткой на фосфоцеллюлозе [17]. Активные фракции хранили в 50% глицерине при -20° .

Синтез РНК с ферментом E. coli проводили в стандартной реакционной смеси в пробах по 50 мкл, содержащих 0,04 М Трис-ацетат (рН 8), 0,02 М MgCl_2 , 0,1 мМ дитиотреит, АТР, ГТР, УТР и СТР по 0,5 мМ, 50 мкг/мл ДНК, 600 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,05 М КСl. Немеченые АТР или УТР заменяли на ^3H -АТР или ^3H -УТР соответственно (удельные радиоактивности указаны в подписях к таблицам). В пробы с ферментом фага Т7 не вводили КСl и добавляли рифампицин (50 мкг/мл), чтобы исключить влияние возможной примеси бактериальной РНК-полимеразы. Пробы инкубировали 20 мин при 30° , после чего фиксировали 5% ТХУ, отмывали на нитроцеллюлозных фильтрах и радиоактивность их определяли на сцинтилляционном счетчике Mark II в толуольном сцинтилляторе.

Синтез полиадениловой кислоты (poly(A)) осуществляли так же, как РНК, но в присутствии 0,01 М MgCl_2 , ^3H -АТР (100 мкг/мл, 1 мкКи в пробу) без других НТР. Перед фиксацией к пробам добавляли KH_2PO_4 до 0,1 М. Как и при синтезе РНК, при инкубации фермента *E. coli* добавляли КСl, а при инкубации фермента фага Т7 — рифампицин.

Седиментация poly(A), синтезированной РНК-полимеразой фага Т7 на (dT)₁₂. Poly(A) синтезировали в двух пробах по 0,25 мл, содержащих стандартную реакционную смесь с $(dT)_{12}$ (12 мкМ), в одну из которых добавляли АрА (0,16 мМ). После инкубации добавляли фосфатный буфер, рН 7,7, до 0,1 М и мочевины до 6 М. Пробы наслаивали на раствор глицерина (4,4 мл) с линейным градиентом концентрации от 5 до 20%, содержащий 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,7, и 6 М мочевины. Центрифугирование проводили 7 ч при 16° и 45 000 об/мин на центрифуге УЦП-60, ротор РКС-50. После центрифугирования во фракциях определяли содержание кислотонерастворимой радиоактивности. Параллельно в тех же условиях осуществляли центрифугирование меченой рибосомной РНК *E. coli* (23S и 16S).

Авторы весьма признательны М. Ф. Шемякину и С. М. Женодаровой за обсуждение статьи; Ю. А. Берлину, З. А. Шабаровой, М. Грюнберг-Маного, В. П. Клягиной, О. А. Смоляниновой и М. И. Хабаровой за олигонуклеотиды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Küpper H., Contreras R., Landy A., Khorana H. G. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 4754—4758.
2. Gilbert W. (1976) in RNA Polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds.), pp. 193—205, Cold Spring Harbor Lab.
3. Krakow J. S., Rhodes G., Jovin T. M. (1976) in RNA Polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds.), pp. 127—157, Cold Spring Harbor Lab.
4. Богданов А. А., Леднева Р. К. (1975) в сб. Итоги науки и техники. Молекулярная биология, т. 5, ВИНТИ, М.
5. Pribnow D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 784—788.
6. Pribnow D. (1975) J. Mol. Biol., **99**, 419—443.
7. Golomb M., Chamberlin M. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 760—764.
8. Chamberlin M., Berg P. (1962) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **48**, 81—94.
9. Chamberlin M., Berg P. (1964) J. Mol. Biol., **8**, 708—726.
10. Chamberlin M. J. (1976) in RNA Polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds.), pp. 17—67, Cold Spring Harbor Lab.
11. Chamberlin M., Ring J. (1973) J. Biol. Chem., **248**, 2235—2244.
12. Salvo R. A., Chakraborty P. R., Maitra U. (1973) J. Biol. Chem., **248**, 6647—6654.
13. Anthony D. D., Zenszotek E., Goldthwait D. A. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **56**, 1026—1033.
14. Anthony D. D., Wu C. W., Goldwait D. A. (1969) Biochemistry, **8**, 246—256.
15. Niyogi S. K., Stevens A. (1965) J. Biol. Chem., **240**, 2587—2598.
16. Niyogi S. K., Wilton P. E. (1969) J. Mol. Biol., **41**, 149—153.
17. Chamberlin M., McGrath J., Waskell L. (1970) Nature, **228**, 227—231.
18. Shishido K. (1973) Biochim. et biophys. acta, **312**, 708—715.
19. Steck T. L., Caicuts M. J., Wilson R. G. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 2769—2778.
20. Falaschi A., Adler J., Khorana H. G. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 3080—3085.
21. Smith D. A., Martinez A. M. (1974) Biochim. et biophys. acta, **353**, 475—486.
22. Nishimura S., Jacob T. M., Khorana H. G. (1964) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **52**, 1494—1501.
23. Niles E. J., Conlon S. W., Summers W. C. (1974) Biochemistry, **13**, 3904—3912.
24. Axelrod N. (1976) J. Mol. Biol., **108**, 753—770.
25. Minkley E. G., Pribnow D. (1973) J. Mol. Biol., **77**, 255—277.
26. Bass I. A., Polonsky Yu. S. (1974) FEBS Lett., **48**, 306—309.
27. Hoffman D. J., Niyogi S. K. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 574—578.
28. Scherzinger E., Herrlich P., Schweiger M. (1972) Mol. and Gen. Genet., **118**, 67—77.
29. Lillehang J. R., Helland D., Sjoberg N. O. (1973) FEBS Lett., **33**, 335—338.
30. Chakraborty P., Bandyopadhyay P., Huang H. H., Maitra U. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 6901—6909.
31. Adman R., Grossman L. (1967) J. Mol. Biol., **23**, 417—439.
32. Blattner F. R., Dahlberg I. E. (1972) Nature New Biol., **237**, 227—232.
33. Dunn J. J., Studier F. W. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 1559—1563.
34. Takeya T., Fujisawa H. (1973) Biochim. et biophys. acta, **324**, 110—119.
35. Minkley E. G. (1974) J. Mol. Biol., **83**, 305—331.
36. Majors J. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 4394—4398.
37. Maitra U., Huang H. H. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **69**, 55—59.
38. Crick F. H. C. (1966) J. Mol. Biol., **19**, 548—555.
39. Topal M. D., Fresco J. R. (1976) Nature, **263**, 289—293.
40. Topal M. D., Fresco J. R. (1976) Nature, **263**, 285—289.
41. Paetkau V., Coulter M. B., Flintoff W. F., Morgan A. R. (1972) J. Mol. Biol., **71**, 293—306.
42. Denisova L. Ya., Pustoshilova N. M., Zagrebely N. (1975) FEBS Lett., **56**, 92—95
43. Springgate C. F., Loeb L. A. (1975) J. Mol. Biol., **97**, 577—591.
44. Gralla J., Crothers D. M. (1973) J. Mol. Biol., **78**, 301—319.
45. Kössel H., Geligier H. (1975) Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe, **32**, 298—508.
46. Туманов Ю. В., Потапов В. К., Кочеткова М. Н., Туркин С. И., Буданов М. В., Шабарова З. А. (1974) Ж. общ. химии, **44**, 1216.
47. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) Молекулярн. биология, **6**, вып. 5, 682—688.
48. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) Биоорган. химия, **1**, 598—603.
49. Zhenodarova S. M., Klyagina V. P., Smolyaninova O. A., Khabarova M. I. (1975) Nucleic Acids Res. Spec. Publ., No 1, 151—154.
50. Миллер Дж. (1976) Эксперименты в молекулярной генетике, «Мир», М.

51. Burgess R. R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6160—6167.
52. Bogdanova E. S., Gorlenko Zh. M., Khourgess E. M. (1974) *Mol. and Gen. Genet.*, **133**, 261—272.

Поступила в редакцию
1.VI.1977

INITIATION SPECIFICITY OF PHAGE T7 AND *ESCHERICHIA COLI* RNA POLYMERASES FOR RNA AND POLY(A) SYNTHESIS

PATRUSHEV L. I., BOCHAROVA T. N., KHESIN R. B.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
I. V. Kurchatov Institute of Atomic Energy, Moscow*

Using synthetic templates it was shown that T7 RNA polymerase has a capability to synthesize poly(A) on the shorter oligodeoxythymidylic sequences than the respective *E. coli* enzyme. The poly(A) synthesis by T7 RNA polymerase is markedly enhanced as a result of the template extension due to addition of untranscribable nucleotide sequences. This enzyme, in contrast to that from *E. coli*, initiates the RNA synthesis on native T7 DNA with GTP or with dinucleoside monophosphates (NpN) containing G exclusively at 3'-position. The formation of poly(A) on denatured T7 DNA by bacterial and virus enzymes is stimulated by any NpN's having 3'-A and by ApG. The synthesis of poly(A) on (dT)₁₂ is markedly enhanced by ApA, whereas the primer activity is diminished to a higher extent by A substitution for U or C than for G, especially at 3'-position. *E. coli* RNA polymerase stimulation of poly(A) synthesis increases with the extension of the oligoadenylic primer, while in the case of T7 enzyme ApA, ApApA, and ApApApA have the same stimulatory effect. Addition of C at 5'-position partially reduced the oligo(A) primer activity. It is *E. coli* RNA polymerase but not the T7 enzyme was found to synthesize poly(U) on denatured T2 DNA. A conclusion is drawn that at least 4 nucleotides at 3'-end a newly synthesized RNA are involved in the interaction with a template within RNA polymerase — template complex. Thus the incorrect incorporation of a non template complementary nucleotide leads to a less efficient RNA-product elongation by the enzymes. The T7 RNA polymerase shows higher specificity than the *E. coli* enzyme during the initiation of transcription. This finding is compared to the fact that the bacterial enzyme in vivo performs the RNA synthesis starting from larger variety of promoters than the T7 RNA polymerase.