

На правах рукописи



ФЕКЛИСТОВ Андрей Владимирович

**Изучение взаимодействий РНК-полимеразы с
однонитевыми и двунитевыми ДНК-аптамерами**

03.00.03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2005

Работа выполнена на Кафедре молекулярной биологии Биологического факультета МГУ, в Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН и в Институте общественного здравоохранения (Public Health Research Institute, г. Ньюарк, США)

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, профессор Крашенинников Игорь Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Костров Сергей Викторович
кандидат биологических наук Патрушев Лев Иванович

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии РАН

Защита состоится « 10 » ноября на заседании Диссертационного совета Д 501.001.76 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, ауд. 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан « 10 » октября 2005 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук



Н. О. Калинина

2006-4
19800

2185 775

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. РНК-полимераза (РНКП) в процессе синтеза РНК осуществляет специфические и неспецифические контакты с одонитевой и двунитевой ДНК. Изучение функционально важных контактов РНКП с ДНК необходимо для детального понимания процесса транскрипции. В клетках бактерий РНКП присутствует в двух формах. Кор-фермент обладает каталитической активностью, но не способен к инициации транскрипции. Узнавание промоторов и инициация синтеза РНК осуществляются холоферментом РНКП, который содержит дополнительную σ -субъединицу. Несмотря на то, что σ играет главную роль в узнавании промоторов, в свободном виде она находится в неактивной конформации и не способна узнавать промоторные последовательности. Было показано, что в маскировании ДНК-связывающих центров σ большую роль играет N-концевой участок белка. При образовании холофермента происходят структурные превращения σ -субъединицы, в результате которых происходит экспонирование её ДНК-связывающих сайтов. Детальные механизмы автоингибирования ДНК-связывающей активности σ -субъединицы, а также механизмы конформационных перестроек σ , происходящих при образовании холофермента и в ходе инициации транскрипции, остаются неизвестными.

В процессе взаимодействия с промотором холофермент сначала узнаёт ДНК, после чего происходит плавление ДНК около стартовой точки транскрипции и устанавливаются контакты с оцДНК. Структура контактов РНКП с промоторными последовательностями на разных этапах узнавания промотора остаётся не изученной. При переходе к элонгации транскрипции контакты с промоторными последовательностями разрываются, происходит диссоциация σ -субъединицы. Элонгация транскрипции осуществляется кор-ферментом РНКП. На этой стадии полимеразы контактирует с ДНК (одонитевой и двунитевой) и РНК в основном сиквенс-неспецифически — эти контакты позволяют ферменту довольно прочно удерживать матрицу и, в тоже время, быстро по ней перемещаться. В процессе этого движения, при добавлении новых нуклеотидов в растущую цепь РНК, а также на стадии терминатии фермент претерпевает конформационные изменения, детальные механизмы которых изучены плохо.

Аптамерами называют одонитевые РНК- или ДНК-лиганды к различным мишеням, получаемые направленным отбором из большого числа различных последовательностей. Метод отбора аптамеров заключается в проведении нескольких циклов связывания библиотеки случайных последовательностей с молекулой-мишенью с разделением свободных олигонуклеотидов и комплексов олигонуклеотидов с мишенью и последующей амплификацией связавшихся последовательностей. Было показано, что аптамеры, полученные

РОС. НАЦИОНАЛЬН.
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
09 10 2006

к белкам, *in vivo* контактирующим с нуклеиновыми кислотами (НК), обычно имитируют природные НК-белковые взаимодействия. Кроме того, аптамеры часто оказываются ингибиторами своих мишеней. Таким образом, аптамеры к РНК-полимеразе могут послужить удобной модельной системой для изучения взаимодействий этого белка с нуклеиновыми кислотами.

Цель работы и задачи исследования. Целью работы являлось получение аптамеров к кор-ферменту и σ -субъединице РНКП и изучение их взаимодействий с РНКП. В работе ставились следующие задачи:

- 1) Получить ДНК-аптамеры к кор-ферментам РНКП *Escherichia coli* и *Thermus aquaticus*, а также к σ -субъединице РНКП *Thermus aquaticus*.
- 2) Исследовать механизмы узнавания аптамеров кор-ферментом и σ -субъединицей РНКП.
- 3) Проанализировать действие аптамеров на активность РНКП.
- 4) Изучить транскрипционные свойства аптамеров в одонитевом и двунитевом состоянии.

Научная новизна и практическая ценность работы. Получены и охарактеризованы высокоаффинные ДНК-аптамеры к кор-ферментам РНКП *Escherichia coli* и *Thermus aquaticus*. Показано, что аптамеры являются эффективными ингибиторами транскрипции. σ -субъединица, а также фактор элонгации транскрипции GreB подавляют связывание аптамеров с РНКП. При помощи аптамеров к РНКП *E. coli* показано, что фактор GreB вызывает конформационные изменения кор-РНКП. Получены ДНК-аптамеры, которые взаимодействуют с изолированной σ -субъединицей *T. aquaticus*. Аптамеры к σ -субъединице содержат последовательность -10 области промотора, окруженную дополнительными консервативными мотивами. Таким образом, впервые показано, что σ -субъединица в свободном состоянии способна узнавать промоторные последовательности ДНК. На основе одонитевых аптамеров к σ -субъединице *T. aquaticus* получен и охарактеризован двунитевой промотор нового типа, специфичный для РНКП *T. aquaticus*. Отобранные в работе аптамеры предполагается использовать в дальнейших структурно-функциональных исследованиях РНКП. Кроме того, результаты работы могут найти практическое применение для создания высокоэффективных промоторов нового типа, а также для получения новых ингибиторов транскрипции.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 121 страницах машинописного текста и содержит 25 рисунков. Библиография включает 125 названий, в том числе 4 русских и 121 иностранных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аптамеры к кор-ферменту РНК-полимеразы

Первая часть данной работы посвящена получению и характеристике аптамеров к кор-ферментам РНКП *E. coli* (Eco) и *T. aquaticus* (Taq). Выбор этих двух РНКП был обусловлен тем, что из первая из них является наиболее полно изученным ферментом с биохимической и генетической точек зрения, а для второй РНКП была расшифрована трехмерная структура, что делает возможной структурную интерпретацию полученных данных.

Получение и общая характеристика аптамеров. Исходная библиотека оцДНК использованная при отборе, имела длину 75 нт. и содержала центральный район со случайной последовательностью длиной 32 нт., окруженный районами с фиксированными последовательностями (рис. 1А). В каждом раунде отбора библиотеку инкубировали с РНКП, ДНК-белковые комплексы отделяли от несвязавшихся олигонуклеотидов, связавшуюся ДНК амплифицировали и использовали для проведения следующего раунда. После проведения отбора обогащенную библиотеку клонировали и определяли последовательности индивидуальных клонов. Данная часть работы была проведена совместно с А.В. Кульбачинским.

Было получено и исследовано тринадцать классов аптамеров к кор-РНКП Eco (E1-E13) и пять классов аптамеров, взаимодействующих с кор-РНКП Taq (T1-T5). Все аптамеры способны формировать различные вторичные структуры, в основном, разнообразные шпильки и G-квартеты. На рис. 1Б приведены предполагаемые вторичные структуры аптамеров к РНКП Taq, а также структура одного из аптамеров к РНКП Eco. Было показано, что аптамеры препятствуют взаимодействию ДНК-матрицы и РНК-транскрипта с кор-ферментом и подавляют транскрипционную активность фермента на синтетической конструкции из олигонуклеотидов, имитирующих нуклеиновые кислоты в составе элонгационного комплекса (минимальной матрице) (Рис. 2). Таким образом, связывание аптамеров происходит внутри главного канала РНКП, в естественных сайтах связывания нуклеиновых кислот.

(А) 5'-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-(N)-CTAGGCCCCGAGTACAGCTT-3'

(Б)

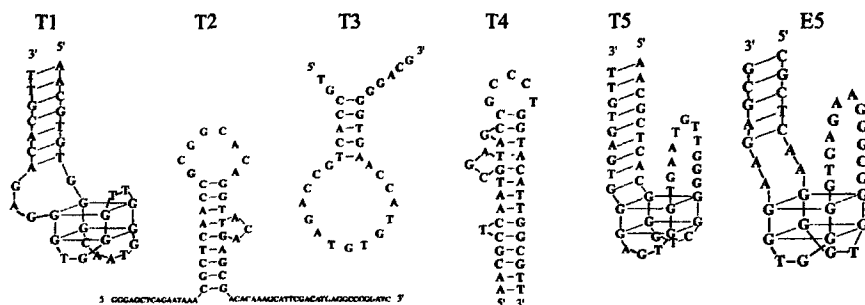


Рис.1. Предполагаемые вторичные структуры аптамеров к кор-РНКП. (А) Случайная библиотека, использованная при отборе **(Б)** Предполагаемая вторичная структура аптамеров к кор-ферменту Таq (Т1-Т5), и также аптамера Е5 к кор-ферменту Есо. Изображены минимальные варианты, полученные из полноразмерных лигандов путем удаления части последовательностей из фиксированных областей библиотеки

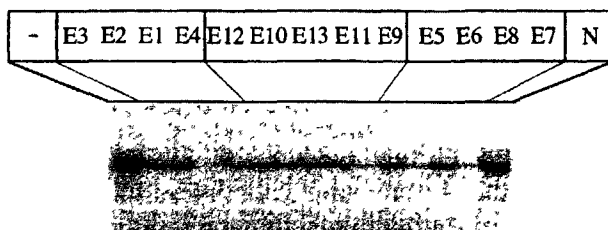


Рис. 2. Влияние аптамеров на каталитическую активность кор-РНКП Есо. РНКП инкубировали с минимальной матрицей из олигонуклеотидов, имитирующих РНК и ДНК в элонгационном комплексе МК (РНК-ДНК гетеродуплекс длиной 8 п н и дуплекс ДНК спереди по ходу транскрипции длиной 18 п н) в присутствии аптамеров, после чего в реакционную смесь вносили α -[32 P]-УТР. Реакцию транскрипции проводили 10 минут при комнатной температуре РНК-продукт длиной 9 нт идентифицировали при помощи электрофореза в 23% ПААГ с последующей радиоавтографией N-исходная случайная библиотека

Влияние σ -субъединицы и фактора GreB на взаимодействие аптамеров с кор-ферментом. σ -субъединица и белок GreB являются белковыми факторами, которые взаимодействуют с кор-ферментом РНКП. В то время как σ -субъединица связывается со стороны главного канала РНКП (Vassylyev et al., 2002, Murakami et al., 2002a), сайт связывания GreB располагается с противоположной стороны, около входа во вторичный канал (Opalka et al., 2004). Оба белка, по-видимому, изменяют конформацию кор-

фермента, поэтому можно было ожидать, что и σ , и GreV могут оказывать влияние на взаимодействие аптамеров с РНКП.

Действительно, было обнаружено, что и σ -субъединица, и фактор GreV ингибируют связывание большинства аптамеров с РНКП. Для анализа механизма подавления связывания аптамеров этими факторами мы измерили кинетику диссоциации РНКП-аптамерного комплекса в присутствии различных лигандов: минимальной матрицы, σ -субъединицы или фактора GreV. При инкубации комплекса РНКП, содержащего радиоактивно-меченый аптамер, с избытком немеченого аптамера время жизни комплекса превышает 1 час (рис. 3). Было показано, что минимальная матрица и σ -субъединица не изменяют скорость диссоциации аптамеров. Таким образом, ингибирование связывания аптамеров с кор-РНКП этими факторами, по-видимому, объясняется, прямой конкуренцией за общие сайты связывания. В отличие от этого, фактор GreV вызывает значительное ускорение диссоциации аптамеров (рис. 3). Вероятно, это свидетельствует о том, что GreV, связываясь с противоположной стороны РНКП, вызывает аллостерические конформационные изменения внутри главного канала РНКП, которые приводят к диссоциации аптамеров.

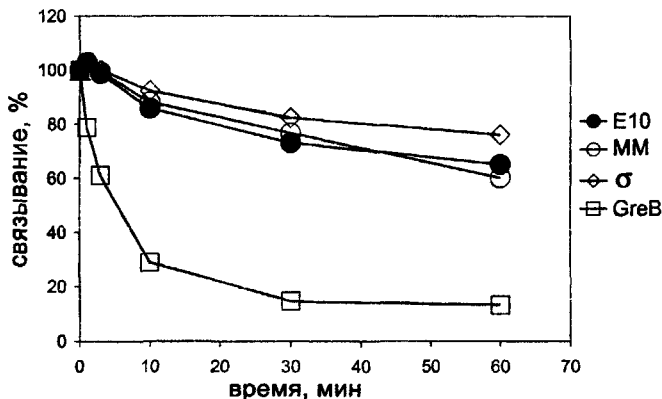


Рис. 3. Влияние σ -субъединицы и фактора GreV на взаимодействие аптамеров с кор-РНКП E10. Приведена кинетика диссоциации комплекса РНКП с аптамером E10 в присутствии разных конкурентов. Кор-фермент преинкубировался с меченым аптамером, затем к комплексу прибавляли избыток немеченого аптамера E10, минимальной матрицы (MM), рифампицина, σ -субъединицы или фактора GreV и измеряли связывание через увеличивающиеся промежутки времени.

Специфическое и неспецифическое взаимодействие аптамеров с главным каналом РНКП. Было обнаружено, что взаимодействие аптамеров с РНКП существенным образом зависит от ионной силы раствора. При исследовании аптамеров к кор-РНКП *Eco* было показано, что при повышенной ионной силе (440 мМ) связывание аптамеров зависит от последовательности, поскольку даже точечные мутации нарушают их связывание с РНКП. Также в этих условиях наблюдалась специфичность аптамеров в отношении кор-фермента *E. coli*: ни один из аптамеров не связывался кор-РНКП *T. aquaticus*. При более низкой ионной силе (< 200 мМ) РНКП также связывает аптамеры с высокой аффинностью, но в этом случае сиквенс-специфичность пропадает. В этих условиях все исследованные последовательности, включая случайную ДНК-библиотеку, обладают одинаковым сродством к РНКП. В то время как при повышенной ионной силе σ -субъединица подавляет связывание аптамеров, при пониженной ионной силе данный эффект не наблюдается. Все олигонуклеотиды подавляют связывание минимальной матрицы с одинаковой эффективностью, что говорит о том, что неспецифическое связывание также происходит в сайтах, взаимодействующих с РНК и ДНК в элонгационном комплексе. В то же время, структура неспецифических комплексов РНКП с аптамерами, видимо, существенно отличается от структуры комплексов, образованных в высокой ионной силе.

В целом, результаты, представленные в данной работе, показывают, что аптамеры к кор-ферменту РНКП являются перспективными лигандами для дальнейших структурно-функциональных исследований РНКП.

Аптамеры к σ -субъединице РНКП *T. aquaticus*

Транскрипция большинства генов домашнего хозяйства в бактериальной клетке осуществляется при участии главной σ -субъединицы (σ^{70} у *E. coli*). Главные σ -субъединицы всех бактерий содержат 4 консервативных района, которые подразделяют на подрайоны (Lonetto et al., 1992; Campbell et al., 2002). Промоторы, узнаваемые этими факторами содержат два гексамерных элемента, необходимых для посадки РНКП: – 10 область с канонической последовательностью ТАТААТ (блок Прибнова), узнаваемую районом 2.4 σ -субъединицы, и – 35 элемент (ТТGACA), узнаваемый районом σ 4.2. Также описан класс промоторов, у которых отсутствует – 35 область. В этом случае – 10 элемент имеет два дополнительных консервативных нуклеотида (TGnТАТААТ), такие промоторы получили название промоторов с удлинённой – 10 областью. В узнавании TG-динуклеотида участвует район 3.0 σ -субъединицы (Gross et al., 1998).

σ -субъединица в свободном состоянии не способна узнавать промоторные последовательности. Для активации ДНК-связывающей активности σ -субъединицы

необходимы конформационные превращения, вызываемые присоединением кор-фермента (Burgess, 1969; Sethi, 1970; Callaci, 1998; Gross, 1998).

Расшифровка трёхмерной структуры фрагментов σ^A -субъединицы *Thermus aquaticus*, а также структур холоферментов бактерий *T. aquaticus* и *T. thermophilus* показало, что σ состоит из трёх доменов, соединённых гибкими линкерами (Campbell, 2002; Murakami, 2002; Vassilyev, 2002). По всей видимости, относительное расположение этих доменов различается для свободной σ и холофермента. Было показано, что связывание σ -субъединицы с кор-ферментом сопровождается существенным увеличением расстояния между районами 2 и 4 (Callaci, 1998). Детальные механизмы этих конформационных изменений остаются неизвестны, прежде всего потому, что структура полноразмерной σ -субъединицы в свободном состоянии остается неизвестной.

Получение и общая характеристика аптамеров. Для изучения ДНК-связывающих свойств изолированной сигмы с помощью протокола SELEX были получены одонитевые ДНК-аптамеры к σ -субъединице РНКП *T. aquaticus* (Taq). Для отбора аптамеров была использована та же библиотека, что и в случае аптамеров к кор-ферменту (см. рис. 1); отбор проводился по похожей схеме. После проведения отбора были определены последовательности 33-х индивидуальных клонов. Все аптамеры содержат гомологичный участок длиной 12 нуклеотидов: ${}^T_6\text{GTA}^C_7\text{AATGGGA}$ (рис. 4). Подчеркнутая последовательность идентична консенсусу – 10 промоторного элемента. ${}^T_6\text{G}$ -динуклеотид встречается в промоторах, не содержащих –35 области, хотя у этих промоторов он отделён от блока Прибнова одним случайным нуклеотидом. Тринуклеотид **GGG** был обнаружен в некоторых генах фагов *E. coli* непосредственно справа от ТАТААТ-подобного элемента (GGGT – у бактериофага λ , GGGA – у фага 80), в этом случае он необходим для σ -зависимого паузирования РНКП (Ring et al., 1996).

Центральный участок гомологии аптамеров можно условно разделить на три элемента: TG-динуклеотид, ТАТААТ-подобный элемент и GGGA-тетрамер. Исследование мутантных производных аптамеров показало, что каждый из этих элементов абсолютно необходим для узнавания σ -субъединицей и мутации по любому из них приводят к потере связывания.

Аптамеры обладают высокой афинностью к σ -субъединице, комплекс аптамера с σ характеризуется кажущимися K_d наномолярного диапазона (7–14 нМ) и временем полужизни около 10 минут. Аптамеры обладают также высокой специфичностью и не связываются с σ -субъединицами РНКП других бактерий (*E. coli* и *Deinococcus radiodurans*, $K_d > 1 \mu\text{M}$).

			Кд, нМ
Клон 15'	CACGGCCGGAG	GGCGGTATCG	9.8
Клон 4,8'	ACCGCGCCGAG	GCTGAACAG	7
Клон 15	GGAGGGCGGAA	GCCGACTGG	13.8
Клон 18'		TGCACTCGAGAATCGTAGTG	13.5
Клон 10'	GGCCACG	GCACCTACGGATG	
Клон 4'	TGCCGCA	GGCCCTCGGTGG	
Клон 2'	GGGGCGAG	CGCCTTCACGG	
Клон 3	GGGCTGCAG	GGCTGTTCAAG	
Клон 18	CGTGGGCGAA	TGCCGCAAGG	
Клон 7	GGAGGGCGAG	GGCTGCAGAG	
Клон 16'	GTCGGGGCGAG	GGCGGTTGG	
Клон 6'	GGAGGCGCCGA	TGCCAAAGG	
Клон 13'	GGCGGGGCTGCC	GGCTTTGG	
Клон 1	GTGCGGGGCGGGG	GGCTTTAG	

Рис. 4. Последовательности некоторых аптамеров к σ -субъединице Taq. Серым показан консервативный участок последовательности аптамеров. Справа приведены Кд для четырех исследованных аптамеров

Предполагаемая структура аптамеров изображена на рисунке 5; все аптамеры, вероятно, содержат шпильки похожей структуры с 3'-конца от последовательности -10 элемента. Для определения участков аптамера, находящихся в тесном контакте с σ -субъединицей, использовался метод футпринтинга гидроксильными радикалами (опыт проводился на полноразмерном варианте аптамера 15'). Наиболее эффективная защита ДНК от ОН-радикалов наблюдалась в участке аптамера, содержащем последовательность Прибнова. Было обнаружено, что второй аденин, последний тимин TATAAT-подобного элемента, а также три гуанина в последовательности GGGA-элемента аптамера защищаются белком с наибольшей эффективностью (см. рис. 3). Очевидно, эти нуклеотиды образуют очень тесные контакты с σ -субъединицей. Соответствующие нуклеотиды в -10 элементе промотора являются наиболее консервативными и важными для работы промотора. В частности, было показано, что -11A необходим для открывания промотора (Lim et al., 2001), а также по-видимому находится в плотном окружении гидрофобного кармана σ -субъединицы (Tsujioka et al., 2002).

В совокупности, полученные данные позволяют утверждать, что связывание аптамеров σ -субъединицей имитирует ДНК-белковые взаимодействия между районом 2.4 σ и нематричной нитью блока Прибнова в открытом промоторном комплексе.

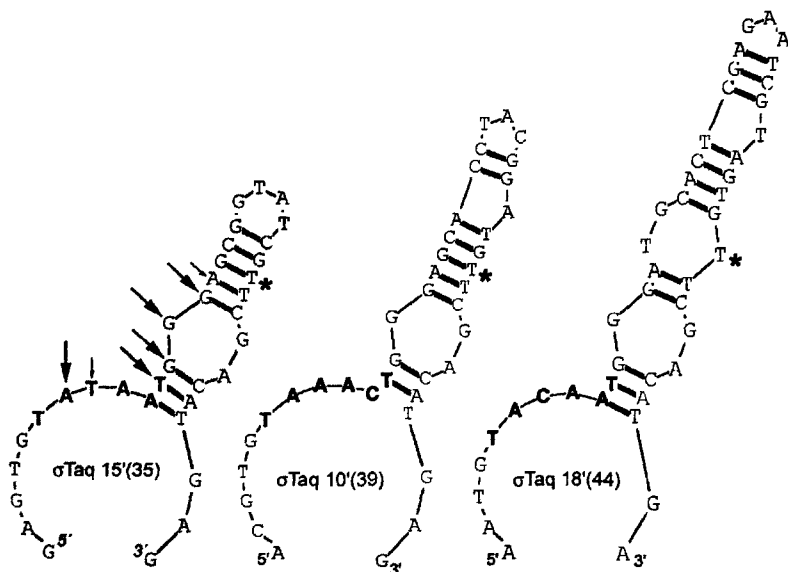


Рис. 6. Предполагаемые вторичные структуры аптамеров к σ -субъединице Taq. Показана предполагаемая структура укороченных вариантов аптамеров из клонов № 15', 10' и 18' длиной 35, 39 и 44 нт, соответственно, полученных из полноразмерных лигандов путем удаления части последовательностей из фиксированных областей библиотеки TATAAT-подобный элемент аптамеров выделен полужирным шрифтом. Нуклеотиды аптамера 15' в консервативном участке, защищаемые σ -субъединицей от гидроксильных радикалов, показаны стрелками (длина стрелки соответствует степени защиты). Звёздочкой показана граница между случайным и константным районом библиотеки

Ингибирование синтеза РНК *in vitro* аптамерами к σ -субъединице. В тесте по транскрипции *in vitro* было показано, что, как и лиганды к кор-ферменту РНКП, аптамеры к σ -субъединице являются эффективными ингибиторами транскрипции (рис. 6). Этот эффект может объясняться не только их взаимодействием со свободной σ -субъединицей, но и с холоферментом РНКП. Чтобы проверить это предположение, было исследовано связывание аптамера с увеличивающимися количествами σ в присутствии избытка кор-фермента. Как видно из рисунка 7, аптамеры связываются холоферментом с большим сродством, чем с σ -субъединицей. Точечная мутация во втором положении -10 последовательности (A→C) предотвращает взаимодействие аптамера как с σ , так и с холоферментом РНКП, что говорит о высокой специфичности связывания аптамеров холоферментом.

Олиго- нуклеотид	-	15'		K		H-олиг		M-олиг		N		-
Концентрация, нМ	-	20	100	20	100	20	100	20	100	20	100	-

CpAp'U → 

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Рис. 6. Влияние различных одонитевых ДНК на активность холофермента РНКП *T. aquaticus*. Холофермент РНКП (20 нМ) и различные оцДНК (в концентрации 20 или 100 нМ) инкубировали в 10 мкл буфера в течение 15 мин. при 23°C. Прибавляли фрагмент дцДНК, содержащий T7A1 промотор (до концентрации 20 нМ), динуклеотидную РНК-затравку CpA (до 10 мкМ) и α -[32 P]-УТР (100 нМ). Синтез тринуклеотида проводили 10 мин при 65°C. Продукты транскрипции идентифицировали денатурирующим электрофорезом в 23% ПААГ с последующей автордиографией. В данном опыте были использованы следующие оцДНК: 15' - укороченный до 45 нт. вариант аптамера 15'; K - олигонуклеотид с последовательностью константных районов случайной библиотеки (длиной 43 нт); H-олиг - содержит последовательность нематричной нити ДНК в -10 области *lacUV5* промотора (ATTGCGTATAATGTGTGGA); M-олиг - комплементарен H-олигонуклеотиду (TCCACACATTATACGCAAT), N - случайная библиотека оцДНК.

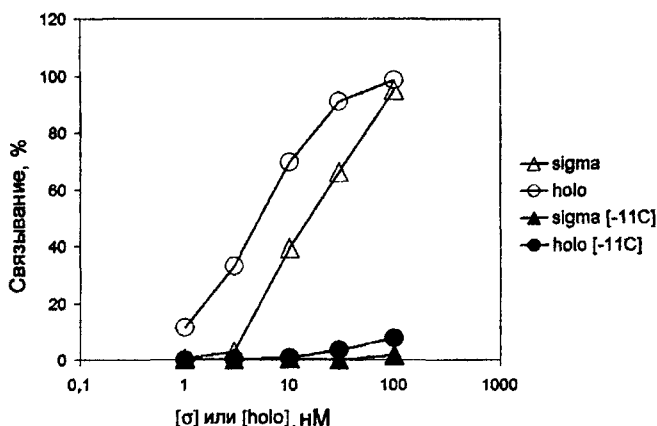


Рис. 7. Узнавание холоферментом РНКП *T. aquaticus* аптамеров и их мутантных производных. Приведены кривые связывания олигонуклеотидов с σ -субъединицей и с холоферментом РНКП. Связывание показано в процентах от общего количества ДНК, внесенной в пробу. Пробы содержали либо только σ -субъединицу, либо σ в присутствии 100 нМ кор-фермента РНКП. В контрольном эксперименте было показано, что в отсутствие σ -субъединицы кор-фермент в концентрации 100 нМ не связывает аптамеры [-11C] - аптамер с точечной мутацией A→C во втором положении последовательности блока Прибнова.

Двунитевая ДНК, содержащая последовательность аптамеров, является промотором нового типа, специфичным для РНКП *T. aquaticus*. Однонитевой ДНК-аптамер к σ -субъединице содержит основной элемент промотора – ТАТААТ. Это позволило предположить, что двунитевой фрагмент ДНК с аптамерной последовательностью может выступать в качестве промотора, специфически узнаваемого РНКП. Для проверки этого предположения при помощи ПЦР были получены дцДНК, содержащие последовательность аптамеров из клонов 8', 10', 15' и 18' (рис. 4). Было показано, что данные последовательности ДНК действительно являются промоторами, специфичными в отношении РНКП *T. aquaticus* (рис. 8). Хотя аптамерный промотор не содержит – 35 элемента, на нём образуется полноразмерный транскрипт; при этом инициация транскрипции происходит примерно на 6 нуклеотидных пар правее последнего тимина в последовательности блока Прибнова. РНКП *E. coli* неактивна на аптамерных промоторах, и лишь на одном из них (15') она образует абортивные продукты (рис. 8).

По своим свойствам аптамерные промоторы напоминают описанные ранее природные промоторы. Так оптимальной температурой для работы РНКП *T. aquaticus* на промоторе, полученном на основе аптамера 15', является 60°C. Высокая чувствительность РНКП к конкурентному ингибитору связывания ДНК гепарину так же напоминает ранее описанные промоторы (*lacUV5*, T7 A1).

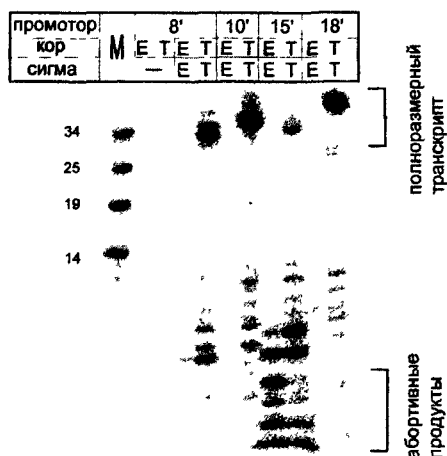


Рис. 8. Холофермент РНКП *T. aquaticus* использует двунитевую ДНК аптамеров в качестве промотора. Приведён радиоавтограф 23% геля денатурирующего электрофореза РНК-продуктов. Реакции синтеза РНК проводились при оптимальных температурах (37 и 65°C для *E. coli* и *T. aquaticus*, соответственно) M – маркеры длины РНК, E – *E. coli* РНКП, T – *T. aquaticus* РНКП

мутируемый элемент	TG		TACAAT		GGGA		WT	
РНКП	Е	Т	Е	Т	Е	Т	Е	Т

полноразмерный
продукт →



Рис. 9. Роль консервативных элементов аптамерного промотора 18' в инициации транскрипции. Приведён радиоавтограф геля денатурирующего электрофореза РНК-продуктов, синтезируемых на аптамерном промоторе и его мутантных вариантах. Указаны консервативные элементы промотора, инактивированные мутагенезом. **WT** – аптамерный промотор дикого типа. **Е** – РНКП *E. coli*, **Т** – РНКП *T. aquaticus*. Транскрипция проводилась при температурах 37 и 65°C.

Для выявления последовательностей ДНК, обеспечивающих инициацию транскрипции на аптамерных промоторах, было исследовано три мутантных варианта промотора, содержащих замены TG-, TATAAT- и GGGA-мотивов. Было показано, что из всех консервативных элементов аптамерной последовательности для транскрипции в двунитевом состоянии оказываются важны TATAAT и GGGA, в то время как TG-динуклеотид может быть мутирован без существенной потери активности РНКП (рис. 9). Тот факт, что аптамерный промотор может работать в отсутствие –35 области, а также TG-элемента позволяет отнести его к новому типу промоторов с ранее не описанным консервативным элементом GGGA, лежащим правее блока Прибнова.

Транскрипция на одонитевых ДНК аптамерах к σ -субъединице РНКП. На двунитевой ДНК транскрипция начинается в строго определенных участках ДНК – промоторах. Для инициации транскрипции ДНК требуется чтобы ее матричная нить в зоне контакта с РНК-полимеразой перешла в одонитевое состояние. Принято считать, что на одонитевой ДНК инициация происходит неспецифически на одонитевых участках, не вовлеченных в образование двунитевых шпилек. Поэтому механизм транскрипции одонитевой ДНК лишь изредка привлекал внимание исследователей.

В то же время, довольно давно было установлено, что существуют сравнительно короткие (20–40 нуклеотидов) последовательности, на которых может происходить специфическая транскрипция с одной стартовой точки. Так, в лаборатории Кораны исследовалась матричная активность химически синтезированного гетеро-олигонуклеотида длиной 29 нуклеотидов. Было установлено, что инициация происходит с АТФ и ГТФ в 5-ом, 7-ом и 9-ом положениях матрицы от 3' конца (Terao et al., 1972).

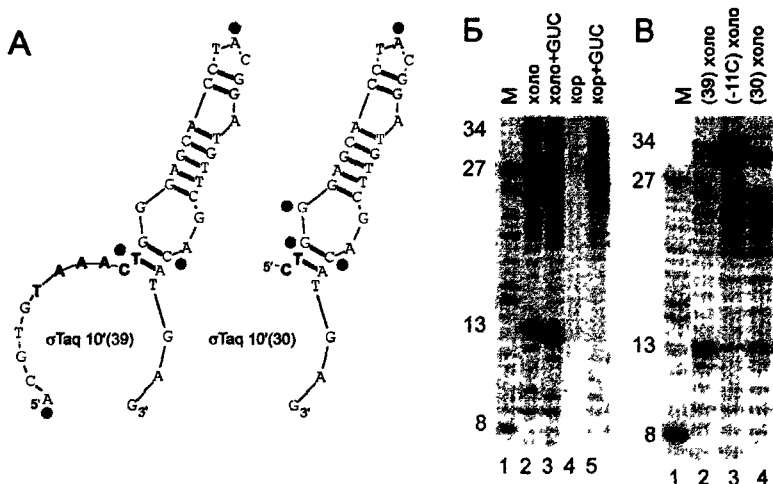


Рис. 10. Синтез РНК холоферментом и кор-ферментом РНКП Taq на одностороннем аптамере 10'. (А) Предполагаемая вторичная структура аптамера 10' длиной 39 нт, и его укороченного варианта длиной 30 нт. Черным кружком обозначена предполагаемая точка инициации транскрипции, серыми кружками – точки остановки синтеза РНК. (Б) Продукты транскрипции кор-фермента и холофермента РНКП на аптамере 10' длиной 39 нт. М-маркер для РНК-продуктов, длины указаны слева от рисунка. (В) Продукты транскрипции холофермента РНКП на мутантных вариантах аптамера 10' (-11С) – аптамер с заменой второго А в -10 элементе; (30) – укороченный вариант аптамера длиной 30 нт, не содержащий -10 области.

Известны также примеры специфической инициации РНК на односторонней ДНК, встречающейся у фагов, содержащих одностороннюю ДНК. До недавнего времени считалось, что эта инициация, обеспечивающая синтез РНК-затравки для репликации ДНК, осуществляется на громоздких структурах, напоминающих промотор в двунитевой ДНК и содержащих двунитевые участки, соответствующие каноническим -10 и -35 областям. Совсем недавно появилось сообщение, что смоделировать синтез праймерной РНК можно на значительно более коротком фрагменте односторонней ДНК, не содержащем ранее постулированных -10 и -35 областей (Zenkin and Severinov, 2004).

Гипотетическая структура аптамеров к σ -субъединице Taq напоминает структуру ДНК в открытом промоторном комплексе (а именно, участок расплавленной области промотора и дуплекс ДНК справа от точки инициации транскрипции). Мы предположили, что данные аптамеры могут выступать в роли матрицы, специфически узнаваемой РНКП. В качестве матрицы для транскрипции был использован укороченный вариант аптамера 10' длиной 39 нт. (рис. 10А) (данный аптамер связывается с изолированной σ -субъединицей с $K_d \sim 35$ нМ). Было обнаружено, что холофермент РНКП Taq синтезирует

на данной матрице набор РНК-продуктов различной длины (рис. 10Б). Было показано, что инициация транскрипции на этой матрице происходит преимущественно в одной точке, расположенной за 6 нт от 3'-конца олигонуклеотида (рис. 10Б). В присутствии тринуклеотидной РНК-затравки GUC большая часть молекул РНК синтезируется с использованием затравки, что отражается на незначительном изменении подвижности продукта длиной 13 нт. (вероятно, это объясняется тем, что на 5'-конце используемого праймера отсутствует трифотфатная группа). По всей видимости, гетерогенность синтезируемых РНК возникает за счет остановок на стадии элонгации синтеза РНК. Лишь незначительная фракция молекул РНКП достигает конца матрицы, синтезируя полноразмерный РНК-продукт длиной 34 нт.; значительная доля транскриптов останавливается в 13-ом положении от стартовой точки.

В отличие от холофермента, кор-фермент не способен транскрибировать аптамер 10' длиной 39 нт (рис. 10Б, дорожка 4). При добавлении праймера GUC синтезируются продукты, рост большинства которых заканчивается не доходя до конца матрицы в районе 25 нуклеотидов от старта (дорожка 5). Таким образом, можно сделать вывод, что для транскрипции на оцДНК-аптамерах необходимо наличие σ -субъединицы, хотя она может быть заменена тринуклеотидной РНК-затравкой.

Роль σ -субъединицы в инициации транскрипции на одонитевых аптамерах может заключаться либо в специфическом узнавании последовательности «расширенного» -10 элемента (TGATAATGGGA), либо в связывании инициаторного нуклеотида (Zenkin et al., 2004). Было обнаружено, что замена аденина во втором положении -10 элемента (TAAACT $\rightarrow$ TCAACT) у аптамера 10' приводит к общей стимуляции транскрипции и способствует прохождению РНКП до конца матрицы (ср. дорожки 3 и 4 на рис. 10В). Более того, удаление большей части -10 области не приводит к уменьшению эффективности инициации транскрипции на аптамере и значительно увеличивает эффективность синтеза полноразмерной РНК (имеющей в этом случае длину 23 нт.). Из полученных данных можно заключить, что для инициации транскрипции на одонитевых аптамерах не важны специфические контакты σ -субъединицы с -10 элементом. Более того, эти контакты, по-видимому, могут мешать РНК-полимеразе осуществлять элонгацию. Можно предположить, что специфические контакты аптамера с σ -субъединицей могут мешать и инициации, так как положение стартовой точки на одонитевом аптамере (рис. 10А) не соответствует ее каноническому расстоянию от -10 последовательности. Так как в присутствии тринуклеотидной затравки инициация происходит в отсутствие σ -субъединицы, можно сделать вывод, что роль σ в инициации транскрипции на одонитевой ДНК, по-видимому, заключается в связывании инициаторных нуклеотидов.

Выводы

1. Получены и охарактеризованы высокоаффинные ДНК-аптамеры к кор-РНК-полимеразам *E. coli* и *T. aquaticus*, которые являются эффективными ингибиторами транскрипции. При помощи аптамеров показано, что фактор GreB вызывает конформационные перестройки внутри главного канала РНКП.
2. Осуществлён поиск ДНК-аптамеров к изолированной σ -субъединице РНК-полимеразы *T. aquaticus*. Отобранные аптамеры содержат последовательность нематричной нити -10 области бактериальных промоторов. Таким образом, свободная σ -субъединица способна узнавать промоторную последовательность в отсутствие кор-фермента РНК-полимеразы. Аптамеры взаимодействуют с РНК-полимеразой с высокой аффинностью и являются эффективными ингибиторами синтеза РНК *in vitro*.
3. Двунитевой фрагмент ДНК, содержащий последовательность аптамера к σ -субъединице *T. aquaticus*, является промотором нового типа, не содержащим -35 области и TG-элемента и специфичным для холофермента РНК-полимеразы *T. aquaticus*. Для узнавания аптамерного промотора необходимо наличие расширенного мотива -10 области TATAATGGGA, содержащего ранее не известный GGGA-элемент.
4. Однонитевой ДНК-аптамер к изолированной σ -субъединице *T. aquaticus* служит матрицей для специфической σ -зависимой инициации транскрипции РНК-полимеразой *T. aquaticus*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kulbachinskiy A., Feklistov A., Krashenninnikov I., Goldfarb A., Nikiforov V. 2004. Aptamers to *Escherichia coli* core RNA polymerase that sense its interaction with rifampicin, σ -subunit and GreB. Eur. J. Biochem. 271: 4921-4931.

2. Feklistov A., Kulbachinsky A., Nikiforov V. DNA aptamers unveil sequence specificity of free sigma factor. FASEB Summer Research Conference "Transcription initiation in Prokaryotes". June 12-17, 2004, Vermont Academy in Saxtons River, Vermont, USA.

3. Феклистов А. В., Кульбачинский А. В., Никифоров В. Г. ДНК-связывающая специфичность σ -субъединицы РНК-полимеразы *T. aquaticus*, изученная методом SELEX. Конференция молодых учёных, аспирантов и студентов по молекулярной биологии и генетике, посвящённая 50-летию открытия двойной спирали ДНК, а также 30-ой годовщине Института молекулярной биологии и генетики академии наук Украины. 25-27 сентября 2003 г., Украина, Киев.

Подписано в печать 05.10.2005
Формат 60×88 1/16. Объем 1 п.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 117
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102

№ 18612

РНБ Русский фонд

2006-4

19800