



УДК 577.113.6 : 577.152.6

СИНТЕЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ УЧАСТКОВ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК

И. * РНК-ЛИГАЗНЫЙ СИНТЕЗ ГЕПТА- И ДЕКАРИБОНУКЛЕОТИДОВ —
КОМПОНЕНТОВ 20-ЧЛЕННЫХ ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДНЫХ МАТРИЦ

*Никитина Т. Т., Шолмитейн Э. А., Шеринь Л. А.,
Ренхоф Р. Ф., Грен Э. Я.*

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Выполнен препаративный РНК-лигазный синтез ряда декарибонуклеотидов, которые составляют 5'- и 3'-половины 20-членных полирибонуклеотидов, моделирующих минимальные участки инициации трансляции фаговых РНК. Декамеры синтезированы через соответствующие гептамеры, также полученные с помощью РНК-лигазы. Кроме декамеров, использованных для создания функционально активного 20-членника, минимального участка инициации трансляции гена репликазы (R) фагов MS2 и fr (последовательность $-17 \rightarrow 3$) и двух его вариантов, синтезированы декануклеотиды для введения модификаций в матрицу. Выделены и структурно охарактеризованы три 5'-концевых декамера: природный АрАрАрСрАрУрGrАрGrG ($-17 \rightarrow -8$) и с заменами нуклеотидов G(-9) \rightarrow A(-9) и U(-12) \rightarrow C(-12), а также три 3'-концевых декамера с отличиями U(-6) \rightarrow A(-6), U(-6)U(-5) \rightarrow A(-6)A(-5) и CCC \rightarrow UUU ($-3 \rightarrow -1$) от природного участка АрУрУрАрСрСрСрАрУрG ($-7 \rightarrow 3$) РНК MS2.

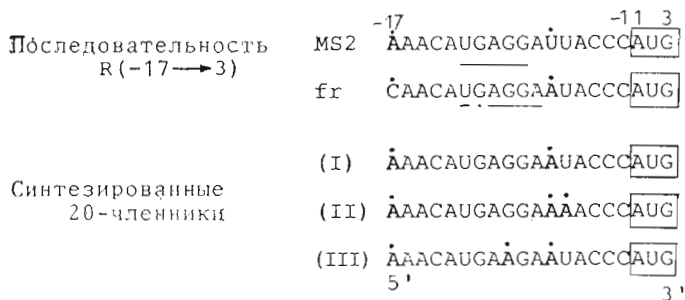
При инициации биосинтеза белка рибосома избирательно узнает участок мРНК в начале гена и образует с этим участком инициации трансляции комплекс инициации [2, 3]. Участок РНК перед началом гена репликазы РНК-содержащих фагов служит одновременно местом присоединения рибосомы при инициации трансляции и связывается также с фаговым белком оболочки — репрессором трансляции гена репликазы. Изучение структурно-функциональной организации этого района мРНК с применением наборов специфических, различающихся по длине фрагментов РНК, соответствующих началу гена репликазы фагов MS2 и fr, дало возможность определить примерные границы участка инициации трансляции [4], расположенного непосредственно перед кодирующей частью гена.

Полученные таким образом результаты обосновали необходимость синтеза коротких полирибонуклеотидов, моделирующих минимальные участки инициации трансляции фаговых РНК.

Первой из модельных структур был синтезированный нами 20-членник АрАрАрСрАрУрGrАрGrGrАрАрУрАрСрСрСрАрУрG, отвечающий фрагменту РНК, достаточному для узнавания фаговым белком оболочки — специфическим репрессором трансляции. Высокая функциональная активность этого полирибонуклеотида открывает возможность путем целенаправленных изменений отдельных элементов структуры изучать природу матричных детерминант инициации трансляции у *Escherichia coli* [5].

Настоящая работа посвящена ферментативному синтезу гепта- и декарибонуклеотидных блоков для последующего получения матричных 20-членных полирибонуклеотидов. Для изучения функциональной активности первоначально нами были синтезированы три 20-членника (I) — (III) (рис. 1), моделирующих минимальный участок инициации гена репликазы (R) фагов MS2 и fr (последовательность R ($-17 \rightarrow 3$)) и соответствующих по длине фрагменту РНК MS2, достаточному для узнавания фаговым белком оболочки [6, 7]. 20-членник (I) отличался от соответствующего участка РНК fr заменой C(-17) \rightarrow A(-17) [8], а от фрагмента РНК MS2 — заменой U(-6) \rightarrow A(-6) [9]. 20-членники (II) и (III) представляют собой

* Сообщение I см. [4].



Декануклеотиды 5'-половины, Декануклеотиды 3'-половины,
последовательность (-17 → -8): последовательность (-7 → 3):

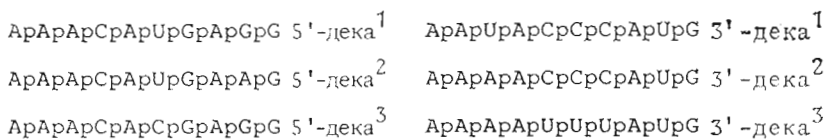


Рис. 1. Матричные полирибонуклеотиды (I) — (III) — варианты последовательности R (-17 → 3) участков фаговых РНК. SD-последовательность подчеркнута, иницирующий кодон заключен в рамку, различающиеся нуклеотиды помечены точкой. Приведены синтезированные декануклеотиды, составляющие 5'- и 3'-половины 20-членников

варианты структуры (I). Синтез этих 20-членников проводили путем катализируемой T_4 РНК-лигазой (КФ 6.1.5.3) сшивки двух декамеров — 5'- и 3'-половин искомого структур. Декамеры, в свою очередь, были получены РНК-лигазным синтезом через соответствующие гептамеры по схеме (тетрануклеотид + тринуклеотид) + тринуклеотид. Для синтеза 3'-дека¹ применен также альтернативный подход: (3 + 4) + 3.

Кроме декамеров, входящих в состав 20-членников (I) — (III), нами синтезированы другие варианты обеих половин этих полинуклеотидов. Нуклеотидные замены в соединениях (I) и (II) локализованы в петлевой части постулированной вторичной структуры 20-членников [10]. Модификация G(-9) → A(-9) в полипуриновом тракте — последовательности Шайна — Далгарно (SD) в соединении (III) — снимает возможность взаимодействия последнего с 3'-концевой частью 16S рРНК, так как UGAGG(-12 → -8) превращается в UGAAG. Замена U(-12) → C(-12) у 5'-дека³ убирает ложный инициаторный кодон [9] и «нонсенс»-кодон UGA [11]. Обе последние модификации в значительной мере должны нарушить и вторичную структуру 20-членников. Замена CCC → UUU на участке (-3 → -1), реализованная в 3'-дека³, должна разрушить вторичную структуру матричного полирибонуклеотида с сохранением SD-последовательности. Эта модификация изменяет также непосредственное окружение инициаторного кодона [12—15]. План синтеза должен обеспечивать уже введенные вышеупомянутые модификации, а также новые варианты с изменением длины синтезируемых полирибонуклеотидов, в частности расстояния между SD-последовательностью и иницирующим кодоном, с заменой отдельных нуклеотидов или их сочетаний в разных участках матрицы и др.

Олигорибонуклеотидные блоки получали набором ферментативных реакций. Ди-, три- и тетрануклеотиды выделяли из гидролизатов соответствующих сополимеров панкреатической (КФ 3.1.27.5) и T_1 (КФ 3.1.27.3) РНКазами и из продуктов ограниченного щелочного гидролиза гомополирибонуклеотидов [16] (рис. 2). Вспомогательные ферменты — щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1) и полинуклеотидкиназу T_4 (КФ 2.7.1.78) применяли для перевода олигомеров в необходимую для РНК-лигазы субстратную форму. Наравнение нуклеотидной цепи на один или несколько остат-

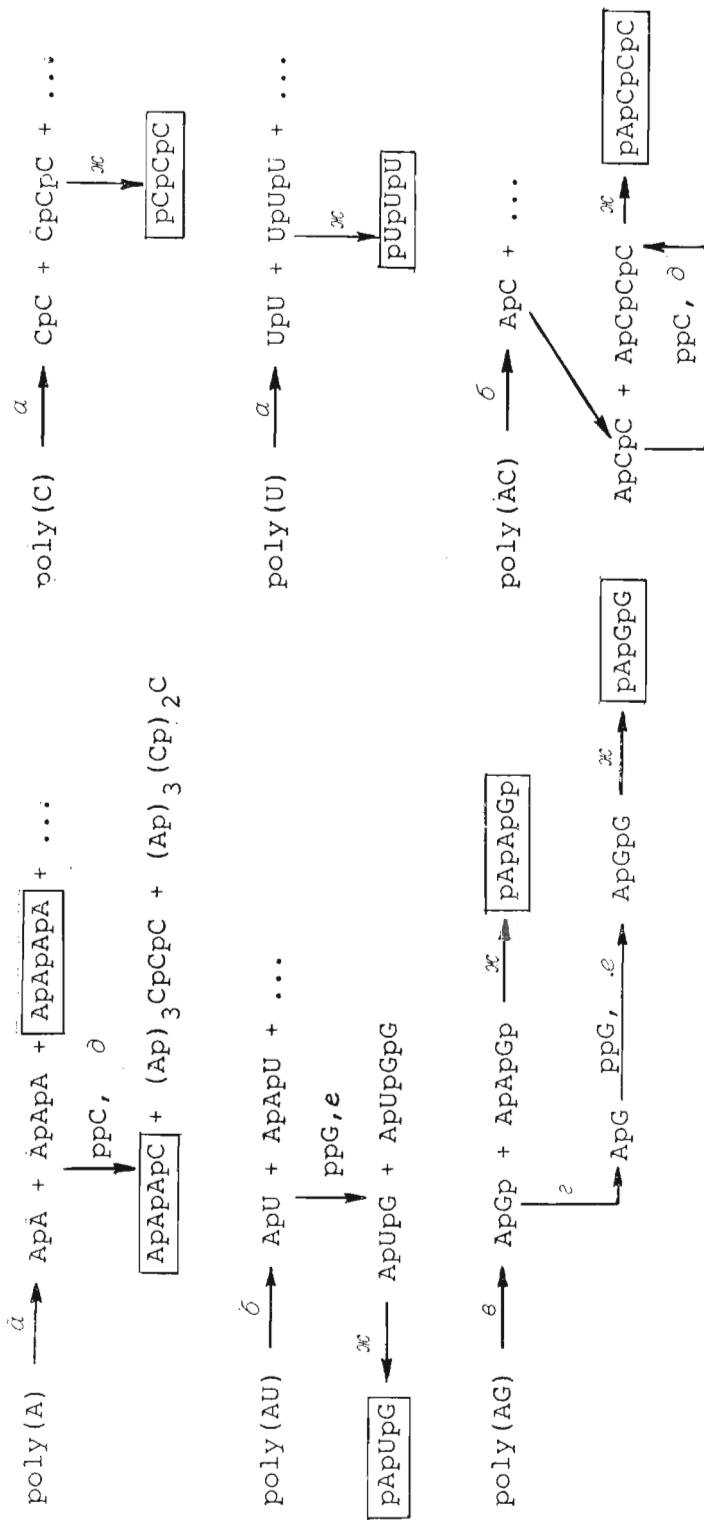


Рис. 2. Получение олигонуклеотидных блоков-субстратов (выделены рамкой) для РНК-лигазного синтеза гетпа- и декануклеотидов. И использованные реакции: a — последовательно щелочной гидролиз и фосфатаза; δ — панкреатическая РНКаза и фосфатаза; e — РНКаза T_1 ; ε — фосфатаза; δ, e — полинуклеотидфосфорилаза *E. coli* (δ) и *M. luteus* (e); \varkappa — АТР и полинуклеотидкиназа T_3

ков проводили полинуклеотидфосфорилазой (КФ 2.7.7.8) из *M. luteus* и *E. coli*. Субстратная специфичность и уровень протекающих при этом реакций (рис. 2) определили выбор вариантов синтеза полинуклеотидов.

Синтез гептануклеотидов. РНК-лигазный синтез шести различных декануклеотидов проходил через соответствующие гептамеры, также продукты реакций, катализируемых T_4 РНК-лигазой. Синтез природного гептамера 5'-половины АрАрАрСрАрУрG проводили шивкой тетра-нуклеотидного акцептора АрАрАрС с 5'-фосфорилированным тринуклеотидным донором рАрУрG. Ранее АрАрАрС зарекомендовал себя в качестве эффективного акцептора [17]; мы также получили довольно хороший выход гептамера как с эквимольным соотношением субстратов (табл. 1), так и с избытком акцептора (см. «Экспер. часть»). Наиболее характерными причинами потери субстратов в этих синтезах с препаратами фермента типов Н и Р являются 5'-дефосфорилирование донора (~9%) и образование неизвестного продукта, более короткого, чем целевой гептамер, в количестве до 20% от исходной суммы субстратов без учета АТФ. С донором рАрСрG с несколько меньшим выходом получили гептануклеотид для синтеза 5'-дека³. В табл. 1 приведен также пример синтеза гептамера АрСрСрСрАрУрG, относящегося к вариантам сборки 3'-половины 20-членников, но характеризующегося использованием рАрУрG в качестве донора. Невысокий в этом случае выход гептамера вполне согласуется с уровнем синтеза 3'-дека¹ и 3'-дека² (табл. 2) и объясняется, по-видимому, общим для этих случаев структурным соответствием субстратов, т. е. наличием трех остатков цитидиловой кислоты на 3'-конце молекулы акцептора.

Природный гептамер 3'-половины АрАрУрАрСрСрС был синтезирован двумя альтернативными вариантами с использованием блоков АрАрУрА + + рСрСрС и АрАрУ + рАрСрСрС. В первом варианте выход оказался невысоким, что вполне согласуется с известными данными о значении 3'-концевого и соседних с ним остатков уридилловой кислоты для ухудшения акцепторных свойств [18]. Вводить в реакцию избыток акцептора АрАрУрА, являющегося в свою очередь продуктом полинуклеотидфосфорилазного синтеза, оказалось нерацональным. В альтернативном варианте после аналитических опытов с соотношениями акцептор : донор 1, 5 и 10 мы остановились на 5-кратном избытке АрАрУ (табл. 1). Гептамеры для 3'-дека² и 3'-дека³ синтезировали с акцептором тетрааденилатом. Выходы АрАрАрАрСрСрС при эквимольном соотношении субстратов (см. «Экспер. часть») и при избытке акцептора (табл. 1) сравнимы и довольно высоки. Характерны потери цитидинсодержащих доноров в результате их самоконденсации и накопления длинных продуктов при их повторном использовании, что в наибольшей степени выражено в случае структурно неоптимального акцептора АрАрУрА (табл. 1; выход длинных продуктов дан в процентах относительно суммы оптического поглощения субстратов без АТФ).

Синтез декануклеотидов (табл. 2). Приступая к синтезу декануклеотидов 5'-половины (последовательности —17 → —8), мы не могли рассчитывать на высокие выходы в силу особенностей структуры 3'-концевой части акцептора АрАрАрСрАрУрG, содержащего остатки уридилловой и гуаниловой кислот. В стандартных условиях синтеза 5'-дека¹ образуется довольно сложная реакционная смесь с набором более длинных продуктов, в настоящее время неохарактеризованных. Для синтеза 5'-дека² применили 3'-защищенный донор рАрАрСр с последующим дефосфорилированием декамера.

Синтезированные в настоящее время декамеры 3'-половины последовательности (—7 → 3) были получены с использованием донора рАрУрG. Эффективность использования акцепторов АрАрУрАрСрСрС и АрАрАрАрСрСрС, различающихся одним остатком уридилловой кислоты в их средней части, одинакова. Сравнительно небольшой выход скорее характерен для трицитидилатной группировки на 3'-концах акцепторов с донором рАрУрG (см. также выше, табл. 1). Использование гептамера АрАрАрАрУрУрU, как и следовало ожидать, в стандартных условиях было низким. В другом варианте, при инкубации в условиях пониженной

Препаративный синтез гептануклеотидов
Активность РНК-лигазы 9000 ед. акт./мл; [АТФ]=2[D]

| Акцептор | Донор (D) | [S], мм | Регенерировано, % | | Выход продуктов, % | | |
|-----------|-----------|----------|-------------------|-------|--------------------|----------|---------|
| | | | акцептор | донор | гептамера | декамера | длинных |
| АрАрАрС | рАрUpG | 6 → 3 | 19,8 | 15,5 | 38,8 | 6,0 | — |
| АрАрАрС | рАрСрG | 10 → 5 | 40,0 | 40,5 | 25,1 | 2,1 | — |
| АрСрСрС | рАрUpG | 13 → 6,5 | 39,6 | 38,3 | 11,0 | — | — |
| АрАрUpА | рСрСрС | 7 → 3,5 | 41,7 | 10,0 | 9,7 | 4,5 | 14,0 |
| АрАрU* | рАрСрСрС | 5 → 2,5 | 62,5 | 28,7 | 36,0 | 5,0 | 4,0 |
| АрАрАрА** | рСрСрС | 10 → 5 | 65,0 | 15,2 | 36,0 | 5,7 | 2,5 |
| АрАрАрА | рUpUpU | 10 → 5 | 57,0 | 30,0 | 41,5 | 5,5 | — |

* Концентрация акцептора изменялась от 25 до 12,5 мМ.

** Концентрация акцептора изменялась от 20 до 10 мМ.

Таблица 2

Препаративный синтез декануклеотидов — 5'- и 3'-половин матричных полирибонуклеотидов

Активность РНК-лигазы 25 000 ед. акт./мл; [АТФ]=2[S]

| Декануклеотид | Акцептор | Донор | [S], мм | Регенерация акцептора, % | Выход декануклеотида, % | |
|----------------------|---------------|---------|-----------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| | | | | | до очистки | после очистки |
| 5'-Дека ¹ | АрАрАрСрАрUpG | рАрGрG | 4 → 2,7 | 45,7 | 20,9 | 11,0 |
| 5'-Дека ² | АрАрАрСрАрUpG | рАрАрGр | 9 → 5 | 46,2 | 15,7 | 8,0 |
| 5'-Дека ³ | АрАрАрСрАрСрG | рАрGрG | 23 → 13 | 86,6 | 5,3 | 2,6 |
| 3'-Дека ¹ | АрАрUpАрСрСрС | рАрUpG | 10 → 5 | 70,0 | 12,8 | 11,5 |
| 3'-Дека ² | АрАрАрАрСрСрС | рАрUpG | 9 → 6 | 72,0 | 15,2 | 11,0 |
| 3'-Дека ³ | АрАрАрАрUpUpU | рАрUpG | 25 → 18 | 72,0 | 6,4 | 4,3 |
| | АрАрАрАрUpUpU | рАрUpG | 15* | 74,0 | 12,5 | 4,7 |
| | АрАрАрАрUpUpU | рАрUpG | 36 → 12** | 55,0 | 15,4 | 13,8 |

* Синтез 17 ч при 14° С.

** Синтез 4 ч при 30° С; фермент добавляли на 0, 60, 120, 180 и 210-й мин.

температуры [19], существенного прироста продукта также не получили. Наиболее удачным оказался синтез при 30° С [20, 21]. К характерной особенности синтеза декануклеотидов можно отнести большой расход акцептора АрАрАрСрАрUpG по сравнению с гептамерами 3'-половины при сравнительно низких, сравнимых выходах очищенных целевых продуктов. В случае декамеров 5'-половины лишь около половины нуклеотидного материала, собранного при первичной хроматографии в области выхода декамеров, составляют индивидуальные вещества. Декамеры 3'-половины оказывались сравнительно чистыми, т. е. наблюдалась меньшая степень превращений субстратов, кроме случая длительного синтеза 3'-дека³ при пониженной температуре (14° С).

Определение нуклеотидной последовательности декамеров. Секвенирование продуктов РНК-лигазного синтеза проводили двумерным способом согласно методике [22] по изменению подвижности [23]. Гептануклеотиды сравнительно легко выделялись в индивидуальном виде, декануклеотиды очищались дополнительной хроматографией на PEI-целлюлозе. Гомогенность декамеров контролировалась электрофорезом в 25% полиакриламидном геле и собственно секвенированием. Наличие однозначно читаемой последовательности в совокупности с хроматографической однородностью свидетельствовало о высокой степени индивидуальности продуктов синтеза. На рис. 3 приведены результаты секвенирования некоторых из синтезированных нами декамеров.

Экспериментальная часть

В работе использовали DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), полиэтилениминцеллюлозу PEI MN 2100 (Macherey, Nagel, ФРГ), PEI-целлюлозные пластинки (Merck, ФРГ), DEAE-сферон 1000 (Сhemapol,

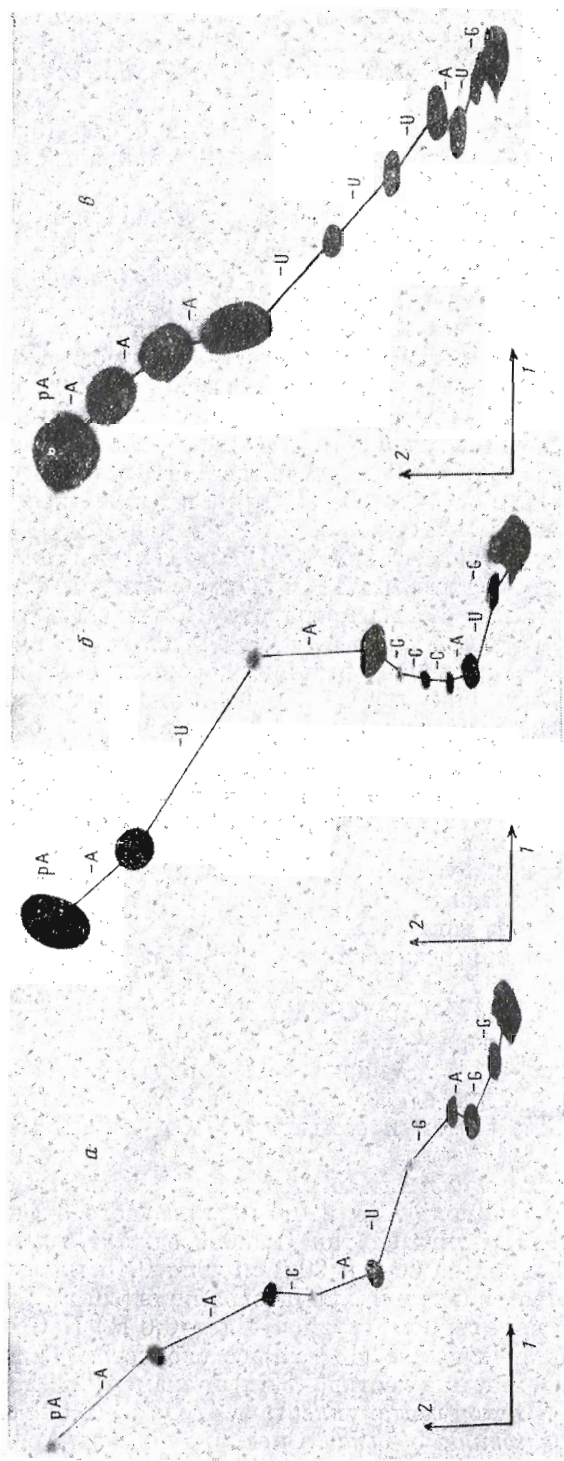


Рис. 3. Секвенирование 5'-дека¹ (а), 3'-дека³ (б) и 3'-дека³ (в). Направление 1 — электрофорез на ацетате целлюлозы, 4000 В, рН 3,5, 40 мин; направление 2 — хроматография в тонком слое РЕИ при 65°, гомосмесь 100 мМ (3%, 1 ч), 3,5 ч

ЧССР), пленку ацетата целлюлозы ТУ-6-05-1696-80, [γ - ^{32}P]АТР с удельной радиоактивностью 37 ПБк/моль (отечественного производства). Радиоавтографию выполняли на рентгеновской пленке РТ-1 («Свема», г. Шостка) в течение 3—10 сут. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре Spesord UV-VIS (ГДР). Аналитические хроматографии проводили на ХЖ-1305 (отечественное производство) на микроколонках объемом 30 мкл с DEAE-сфероном 1000 в 7 М мочеvine, 0,01 М трис-НСl, рН 7,6, в градиенте NaCl (0—1 М, ступень 0,05 М по 120 мкл, 500 мкл/ч).

РНК-лигазный синтез. Субстраты, АТР и буфер (0,1 М трис-НСl (рН 8,3), 0,02 М MgCl₂, 0,002 М дитиотреит) упаривали на ротонном испарителе в маленьких колбочках или, в аналитическом варианте, в силиконизированных микропробирках. Объем буфера обычно был равен конечному объему РНК-лигазы. Фермент добавляли тремя порциями на 0,40 (60) и 80-й (90) мин, в результате чего концентрация субстратов [S] постепенно уменьшалась (см. табл. 1 и 2). После завершения синтеза (обычно 2 ч при 37° С) реакционную смесь разбавляли водой и депротенизировали смесью изоамилового спирта с хлороформом (1 : 3). Использовали препараты Т₄ РНК-лигазы трех типов: собственного приготовления (тип Р), из Бердского НИКТИ БАВ (тип Н) и Вильнюсского НИО «Фермент» (тип В). Удельная активность дана по образованию фермент-аденилатного комплекса. Выход продуктов РНК-лигазного синтеза оценивали по использованию донорных (D) нуклеотидов, взятых в реакцию (кроме случаев, указанных отдельно).

Синтез гептануклеотида АрАрАрСрАрUpG. Смесь 5 мкмоль АрАрАрС, 3,4 мкмоль рАрUpG, 7 мкмоль АТР и 1,7 мл лигазного буфера упаривали, остаток растворяли в 1,7 мл препарата РНК-лигазы (тип В, 4000 ед. акт./мл) и инкубировали 2 ч при 37° С, добавляли через 40 и 80 мин по 1 мл фермента. По завершении реакции добавили 5 мл воды, фермент инактивировали (2 мин при 100° С) и обработали 5 мл депротенизирующей смеси. После центрифугирования 15 мин при 5000 об/мин слои разделяли, нижний слой промывали водой (2 × 5 мл). Водные слои объединяли и наносили на колонку (1,4 × 50 см) с DEAE-сефадексом (СН₃СОО⁻). После промывки 400 мл 0,01 М трис-ацетата, рН 7,6, в 7 М мочеvine элюировали со скоростью 20 мл/ч линейным градиентом (0—0,6 М, 2 л) СН₃СООНа в исходном буфере. Собирали 95% поглощающего вещества; при концентрации элюента 0,3 М элюировался акцептор, при 0,48 М — гептануклеотид и при 0,58 М — декамер (образовавшийся в результате повторного присоединения донора). Разбавляли в 5 раз водой, наносили на колонку с DEAE-сефадексом (СО₃²⁻) (5 мл; для декамера — 1 мл). Промывали водой, 400 мл 0,04 М (NH₄)₂СО₃ и элюировали по 300 мл (NH₄)₂СО₃: для акцептора — 0,04—0,4 М, для гептамера — 0,04—1 М, для декануклеотида — 1 М. Упаривали в вакууме с добавлением воды и спирта. Получили 87 ОЕ₂₆₀ (1,67 мкмоль, 33%) акцептора, 136 ОЕ₂₆₀ (1,54 мкмоль, 45,3%) гептануклеотида и 8,5 ОЕ₂₆₀ (0,07 мкмоль, 2%) декамера.

Синтез гептануклеотида АрАрАрАрСрСрС. Смесь 2 мкмоль АрАрАрА, 2 мкмоль рСрСрС, 4 мкмоль АТР и 0,6 мл лигазного буфера упаривали, добавляли 0,3 мл РНК-лигазы (тип Н; 8000 ед. акт./мл), инкубировали 2 ч при 37° С, добавляя на 60-й и 90-й мин по 0,15 мл фермента. После инактивации и депротенизации хроматографируют на DEAE-сефадексе (Cl⁻; 0,6 × 50 см) в линейном градиенте (0—0,6 М) NaCl в 0,01 М трис-НСl, рН 7,6, и 7 М мочеvine (400 мл) со скоростью 15 мл/ч. Акцептор (элюция при 0,22 М), гептануклеотид (0,32 М) и декамер (0,38 М) обессоливали, как описано выше. Выход гептануклеотида 47 ОЕ₂₆₀ (0,58 мкмоль, 29%).

Синтез декануклеотида 5'-дека¹. Смесь 0,8 мкмоль АрАрАрСрАрUpG, 0,8 мкмоль рАрGrG, 1,6 мкмоль АТР и 0,4 мл лигазного буфера упаривали и инкубировали 2 ч при 37° С с РНК-лигазой типа Р (25 000 ед. акт./мл), добавляя сначала 0,2 мл, а на 40-й и 80-й мин — по 0,05 мл фермента. Реакционную смесь разделяли на DEAE-сефадексе (Cl⁻; 0,6 × 30 см) в линейном градиенте NaCl (0—0,4 М; 400 мл). Непрореагировав-

ший гептамер собирали при 0,28 М и рехроматографировали в системе с $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. 5'-Дека¹ (собран при 0,32 М NaCl) рехроматографировали в линейном градиенте NaCl (0—1 М; 200 мл) на колонке с РЕГ-целлюлозой (V 0,5 мл, h 6 см; 10 мл/ч), а затем на такой же колонке в градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0,02—1,4 М; 200 мл) с добавлением 20% спирта. Декануклеотид (при 0,85 М) обессоливали упариванием, выход 11 ОЕ₂₆₀ (0,09 мкмоль, 11%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Renhof R., Cielens I., Nikitina T., Sherinya L., Shomshtein Z., Gren E. J. FEBS Lett., 1985, v. 185, N 2, p. 277—281.
2. Грен Э. Я. Молекуляр. биология, 1981, т. 15, № 4, с. 725—751.
3. Gren E. J. Biochimie, 1984, v. 66, № 1, p. 1—29.
4. Berzin V., Cielens I., Jansone I., Gren E. J. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 23, p. 7763—7775.
5. Ренхоф Р. Ф., Никитина Т. Т., Шеринь Л. А., Шомштейн З. А., Циеленс И. Э., Берзинь В. М., Грен Э. Я. Тез. докл. 16-й конференции ФЕБО. М., 1984, с. 411.
6. Jansone I., Berzin V., Gribanov V., Gren E. J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 5, p. 1747—1760.
7. Krug M., de Haseth P. L., Uhlenbeck O. C. Biochemistry, 1982, v. 21, № 19, p. 4713—4720.
8. Циеленс И. Э., Янсоне И. В., Грибанов В. А., Вишневский Ю. И., Берзинь В. М., Грен Э. Я. Молекуляр. биология, 1982, т. 16, № 5, с. 1109—1115.
9. Berzin V., Borisova G. P., Cielens I., Gribanov V. A., Jansone I., Rosenthal G., Gren E. J. J. Mol. Biol., 1978, v. 119, № 1, p. 101—131.
10. Borisova G. P., Volkova T. M., Berzin V., Rosenthal G., Gren E. J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 5, p. 1761—1774.
11. Atkins J. F. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 4, p. 1035—1041.
12. Ganoza M. C., Fraser A. R., Neilson T. Biochemistry, 1978, v. 17, № 14, p. 2769—2775.
13. Ganoza M. C., Sullivan P., Cunningham C., Hader P., Kofoid E. C., Neilson T. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 14, p. 8228—8232.
14. Schmitt M., Manderschied U., Kyriatsoulis A., Brinckmann U., Gassen H. G. Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 1, p. 291—299.
15. Eckhardt H., Luhrmann R. Biochemistry, 1981, v. 20, № 8, p. 2075—2080.
16. Шеринь Л. А., Шомштейн З. А., Ренхоф Р. Ф. Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1983, № 5, с. 622—625.
17. Uhlenbeck O. C., Cameron V. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 1, p. 85—98.
18. England T. E., Uhlenbeck O. C. Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2069—2076.
19. Romaniuk E., McLaughlin L. W., Neilson T., Romaniuk P. J. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 3, p. 639—643.
20. Ohtsuka E., Nishikawa S., Fukumoto R., Tanaka S., Markham A. F., Ikehara M., Sugiura M. Eur. J. Biochem., 1977, v. 81, № 2, p. 285—291.
21. Ямкоой В. И. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1808—1812.
22. Volckaert G., Min Jou W., Fiers W. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1, 2, p. 433—446.
23. Tu C.-P. D., Jay E., Bahl C. P., Wu R. Anal. Biochem., 1976, v. 74, № 1, p. 73—93.

Поступила в редакцию
24.VII.1985

SYNTHESIS AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF TRANSLATION INITIATION REGIONS IN mRNA. II. RNA-LIGASE SYNTHESIS OF HEPTA- AND DECARIBONUCLEOTIDES, CONSTITUENTS OF 20-BASE POLYRIBONUCLEOTIDE TEMPLATES

NIKITINA T. T., SHOMSHEIN Z. A., SHERINYA L. A.,
RENHOF R. F., GREN E. J.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences
of the Latvian SSR, Riga*

Preparative RNA-ligase synthesis of decaribonucleotides, the 5'- and 3'-constituent parts to be used for the synthesis of 20-base polyribonucleotides; simulating minimal translation initiation regions for phage RNA was carried out. The decamers were obtained via appropriate heptamers also by RNA-ligase catalyzed synthesis. Apart from decamers used to prepare the functionally active 20-base polyribonucleotide, the minimal translation initiation region of the replicase gene (R) in MS2 and ϕ phage — sequence R(—17 → 3) and two its variants, decanucleotides for other template modification were also synthesized. Three 5'-terminal decamers were isolated and identified including the natural decamer ApApApCpApUpGpApGpG (—17 → —8) and those with G(—9) → A(—9) and U(—12) → C(—12) nucleotide substitutions, as well as three 3'-terminal products differing from the natural region ApUpUpCpCpApUpG (—7 → 3) in MS2 RNA by U(—6) → A(—6), U(—6)U(—5) → A(—6)A(—5) and CCC → UUU (—3 → —1) substitutions.