



УДК 547.963.32.04

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ
E. COLI С АНАЛОГАМИ ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ ДНК
БАКТЕРИОФАГА *fd*, СОДЕРЖАЩИМИ В МАТРИЧНОЙ ЦЕПИ
ОСТАТКИ 5-БРОМУРАЦИЛА

Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г.,
Скиба Н. П., Липкин В. М.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина
Академии наук СССР, Москва

Синтезирован ряд аналогов промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd*, содержащих в различных участках матричной цепи фоточувствительные остатки 5-бромурацила. Осуществлено ковалентное связывание этих модифицированных промоторов с РНК-полимеразой *E. coli* под действием УФ-света. Установлено, что во взаимодействии с этим ферментом вовлечены такие функционально важные участки промотора, как районы стартовой точки транскрипции, «боксы Прибнова» и (–35)-нуклеотида. Показано, что в контакте с «минус»-нитью ДНК находится одна из больших субъединиц РНК-полимеразы и σ -фактор, в то время как α -субъединица не принимает непосредственного участия во взаимодействии с промотором.

В продолжение работ по структурно-функциональному изучению ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* предпринято исследование функциональной топографии комплекса этого фермента с синтетической промоторной областью G2 ДНК бактериофага *fd* [1], активность которой *in vitro* и *in vivo* была показана ранее [2]. Настоящее сообщение посвящено изучению взаимодействия субъединиц РНК-полимеразы с фотореактивными аналогами промоторной области, в которых ряд остатков тимина в «минус»-цепи замещен на 5-бромурацил.

С этой целью было синтезировано четыре модифицированных промотора (P1 – P4), содержащих фоточувствительные остатки 5-бромурацила в определенных положениях матричной цепи, например в таких функционально важных районах промоторной области, как точка инициации транскрипции, «бокс Прибнова» (расположен на расстоянии приблизительно 10 нуклеотидов до места старта мРНК) и участок (–35)-нуклеотида. Структура этих полинуклеотидов приведена на рис. 1.

Получение фрагментов P1 – P4 осуществлялось методом ограниченного матричного копирования, который был предложен нами ранее и заключается в контролируемом удлинении синтетического полинуклеотида – «праймера» на одноцепочечной матрице с помощью ДНК-полимеразы в присутствии полинуклеотида – «стопнера», терминирующего рост образующейся цепи [1]. Использование этого метода при получении полинуклеотидов позволяет направленно вводить в их состав модифицированные звенья, а также локальную, внутреннюю ^{32}P -метку благодаря использованию при синтезе меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

При получении промотора P1, в котором все остатки дезокситимидина «минус»-цепи между –47 и +6 нуклеотидами замещены на 5-бромдезок-

синуридин, в качестве «праймера» был взят полинуклеотид (А — В'), а в качестве «стоппера» — декануклеотид (Н), имеющий на 3'-конце цепи фосфатную группу. «Праймер» и «стоппер» комплексовали с одноцепочечной ДНК бактериофага *fd* и затем проводили ферментативный синтез комплементарной (—)-цепи в присутствии ДНК-полимеразы Т4, 5-Br-дезоксисуридинтрифосфата и α -³²P-меченых дезоксиаденозин-, дезоксицитидин- и дезоксигуанозинтрифосфатов. При этом на основе заправки (А — В') имела место элонгация, останавливающаяся у 5'-конца сегмента (Н). Введение в инкубационную смесь ДНК-лигазы Т4 и АТФ приводило к соединению «стоппера» с 3'-концом удлинившегося «праймера». Полученный дуплекс вырезался с помощью S₁-нуклеазы, специфичной к одноцепочечным участкам ДНК.

Синтез промоторов PII, PIII и PIV, содержащих остатки 5-Br-урацила и ³²P-метку в районе «бокса Прибнова», 0-точки и (—35)-нуклеотида соответственно, был осуществлен аналогично синтезу промотора PI с использованием различных наборов «праймеров», «стопперов» и дезокси-нуклеозидтрифосфатов (см. «Экспериментальную часть»).

Ковалентному связыванию модифицированных промоторов с РНК-полимеразой под действием УФ-света предшествовало исследование комплексообразования этих дуплексов с ферментом в 0,12 М КСl при 37° С в присутствии избытка одноцепочечной ДНК, как это было описано для немодифицированного промотора [2]. Количество ³²P-меченого дуплекса, задерживающегося на нитроцеллюлозных фильтрах за счет взаимодействия с РНК-полимеразой, составило в среднем 75% (ср. с данными табл. 1 в сообщении [2]). Однако стабильность комплексов с 5-Br-урацилсодержащими промоторами была примерно в 10 раз выше, чем с немодифицированным промотором. Период полураспада комплекса РНК-полимеразы с немодифицированным промотором Р в 0,2 М КСl составил 10—15 мин, а с промотором PII, содержащим лишь 4 остатка 5-бромдезоксисуридина, — более 2 ч. Чтобы полностью разрушить комплексы с модифицированными промоторами за 2—5 мин, необходимо было действие либо высокой солевой концентрации (1 М КСl в сочетании с 7 М мочевиной), либо додецилсульфата натрия.

Далее была определена структура участка ДНК, непосредственно прикрываемого РНК-полимеразой при образовании иницирующего комплекса с модифицированными и немодифицированными промоторами. Для этого использовался метод «футпринтирования», недавно предложенный Галасом и Шмитцем [3] и состоящий в исследовании фрагментов, получаемых частичным гидролизом панкреатической ДНКазой комплекса ДНК — белок, в котором нуклеиновая кислота мечена только по одному концу. Полученные в присутствии GTP комплексы РНК-полимеразы с дуплексами Р и PI, имеющими метку только на 5'-конце «минус»-цепи, подвергались частичной деградации дезоксирибонуклеазой, а затем электрофорезу в 20% полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины. Для сравнения на тот же гель помещали гидролизат промотора, полученный в аналогичных условиях в отсутствие РНК-полимеразы. Фрагменты, отсутствующие в основном образце по сравнению с контрольным, соответствовали участкам ДНК, на которых происходило взаимодействие промотора с ферментом.

Было обнаружено, что в случае немодифицированного промотора Р РНК-полимераза защищала от расщепления нуклеазой участок «минус»-цепи этого фрагмента ДНК, расположенный приблизительно между (+15) — (+17)- и (—22) — (—24)-нуклеотидами (практически полное исчезновение радиоактивных полос). Кроме того, в районе (+30) — (—40)-нуклеотидов наблюдалось ослабление интенсивности радиоактивных полос. Первый участок, который находится в тесном контакте с ферментом, соответствует фрагменту промоторной области, выделяемому при более жесткой обработке комплекса с РНК-полимеразой ДНКазой I [4], и вклю-

чает в себя район «бокса Прибиова» и участок инициации транскрипции. Второй район связывания с ферментом расположен в другом функционально важном участке промотора — вблизи (−35)-нуклеотида. Однако только частичное ослабление интенсивности радиоактивных полос на полиакриламидном геле свидетельствует, что здесь контакт с РНК-полимеразой менее тесный и доступность для действия нуклеазы больше, чем в первом случае (рис. 2).

«Футпринтирование» комплекса промотора P1 с ферментом показало, что РНК-полимераза прикрывает на дуплексе те же участки, что и на немодифицированном полинуклеотиде. Следовательно, введение остатков 5-Br-дезоксинуридина не повлияло на специфичность взаимодействия промотора с РНК-полимеразой.

При облучении комплексов РНК-полимеразы *E. coli* с дуплексами P1 — PIV УФ-светом с максимумом 254 нм происходило образование ковалентных связей между ферментом и нуклеиновой кислотой, устойчивых к действию высокой концентрации соли (1 М КСl в присутствии 7 М мочевины) и додецилсульфата натрия. Как было установлено методом связывания на нитроцеллюлозных фильтрах, фотоиндуцированному сшиванию подвергалось до 50% промотора, образующего комплекс с РНК-полимеразой.

Распределение фотоаффинной метки между субъединицами РНК-полимеразы изучали с помощью электрофореза в 7% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Перед нанесением на полиакриламидный гель УФ-облученный комплекс (³²P-меченый промотор — фермент) обрабатывали эндонуклеазой для деградации цепи ДНК до небольших фрагментов, оказывающих меньшее влияние на подвижность модифицированных ими субъединиц при электрофорезе по сравнению с модификацией целым промотором. Связанные с радиоактивными фрагментами нуклеиновой кислоты субъединицы фермента обнаруживали на геле после проведения электрофореза с помощью радиоавтографии, аналогично тому, как это было сделано при УФ-сшивке РНК-полимеразы с олигонуклеотидами [5].

При проведении ковалентного связывания в бинарном комплексе с промоторами P1 — PIV радиоактивная метка располагалась при электрофорезе в районе больших субъединиц (β' и β) РНК-полимеразы, а также σ -фактора. α -Субъединица во всех случаях не затрагивалась (рис. 3). Как можно видеть из таблицы, количество радиоактивной метки, введенной в σ -фактор, и суммарное количество метки в β' - и β -субъединицах было практически одинаковым во всех случаях, кроме промотора PIV, модифицированного 5-бромдезоксинуридином в районе (−35)-нуклеотида (70% метки в σ -субъединице). Такие же результаты были получены при проведении УФ-сшивки в присутствии gGTP и gUTP (инициаторный комплекс). Из-за некоторой дискретности размеров и довольно большой длины фрагментов промотора (20—30 нуклеотидов), ковалентно связанных с белком, не удалось достичь точного совпадения зон модифицированных и немодифицированных субъединиц на геле-электрофорезе и провести прямое определение относительного количества метки в β' - и β -субъединицах, как это было осуществлено нами ранее в случае УФ-сшивки РНК-полимеразы с oligo (dT) [5]. При замене ДНКазы I на микрококковую нуклеазу были получены аналогичные результаты. Добавление к эндонуклеазам фосфодиэстераз приводило к утончению радиоактивных зон при электрофорезе, но не вело к существенному изменению их положения относительно немодифицированного белка. Однако самая яркая радиоактивная зона, располагающаяся выше немодифицированной β' -субъединицы, достаточно узка и принадлежит скорее всего лишь одной из больших субъединиц (рис. 3).

Было также проведено сравнение этих данных с результатами экспериментов по ковалентному связыванию РНК-полимеразы с непромотор-

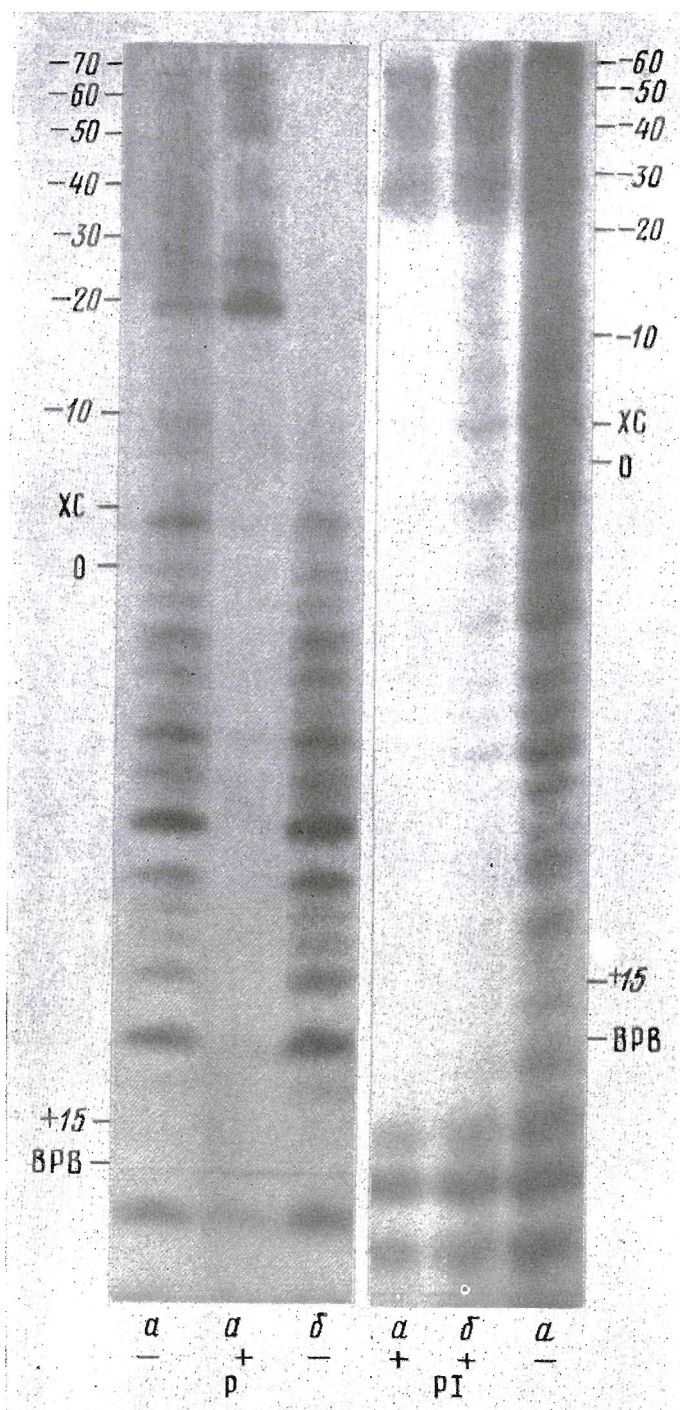


Рис. 2. «Футпринт» фрагментов, полученных при действии ДНКазой I в течение 30 (а) и 45 с (б) на промоторы Р и РІ (-) и на их комплексы (+) с РНК-полимеразой

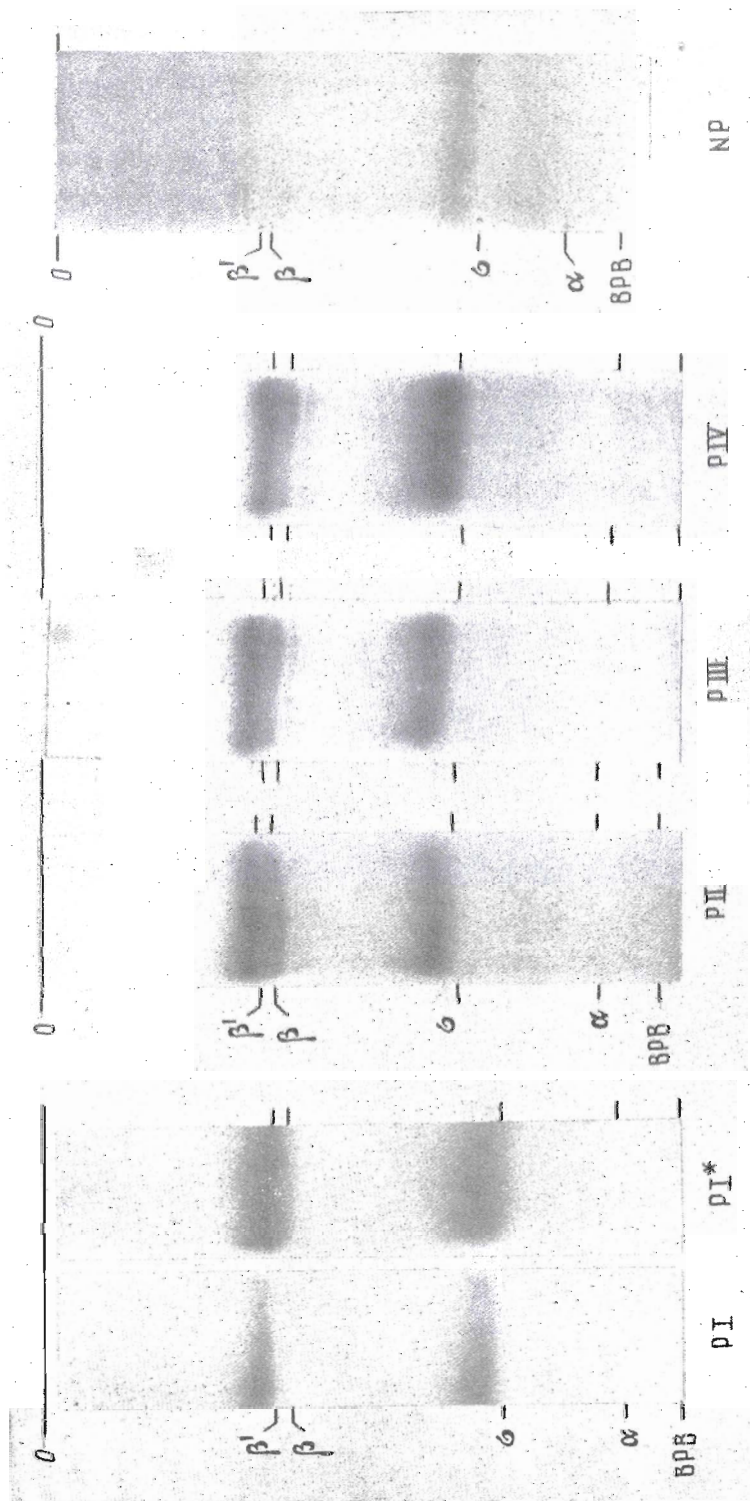


Рис. 3. Радиоавтографы гелей, полученных при разделении субъединиц РНК-полимераза после обработки УФ-синих комплексов этого фермента с промоторами P1 - PIV и непромоторным участком NP мангровидной ДНКазой I и фосфодиэстеразой змеиного яда. Показано положение на геле белковых зон, соответствующих субъединицам фермента. 0 - старт, BRB - бромфеноловый голубой. P1 - проведена обработка только ДНКазой I

Распределение ^{32}P -метки между субъединицами РНК-полимеразы *E. coli* в результате УФ-сшивки с 5-бромурацилсодержащими аналогами промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd**

Субъединицы	Вхождение метки при сшивке **				
	с промоторами				с непромоторным районом
	PI	PII	PIII	PIV	
α	<1	<1	<1	<1	10
σ	45	40	50	70	85
$\beta+\beta'$	55	60	50	30	5

* Приведены усредненные результаты из трех опытов.

** Рассчитывается как процент от общего количества радиоактивности, вошедшей в фермент.

ным участком ДНК. Такой фрагмент, соответствующий 3'-концевой последовательности гена II ДНК фага *fd*, был получен с помощью достройки «праймера» (I) на (+)-нити ДНК этого бактериофага в присутствии dBrUTP и трех ^{32}P -меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, один из которых брали в количестве, достаточном для получения полинуклеотида длиной не более 100 звеньев [6]. После обработки S₁-нуклеазой и выделения непромоторный фрагмент подвергали УФ-сшивке с РНК-полимеразой в тех же условиях, что и промоторы PI—PIV. При этом метились преимущественно σ -субъединица и незначительно одна из больших субъединиц и α -субъединица (рис. 3). Эффективность прохождения УФ-сшивки была при этом примерно на два порядка ниже, чем в случае ковалентного связывания с промоторной областью.

Способность σ -фактора ковалентно связываться под действием УФ-света как с промотором, так и с непромоторным участком ДНК свидетельствует о его участии в узнавании этого регуляторного района не только опосредованно, путем соответствующего изменения конформации «core»-фермента [7], но и непосредственно — путем взаимодействия с ДНК на всех этапах инициации транскрипции (поиск и селекция промоторов, образование прочного бинарного комплекса и собственно инициация синтеза РНК). Наши данные подтверждаются также результатами, полученными другими авторами. Симпсон [8] осуществил ковалентную сшивку РНК-полимеразы с 5-Br-дезоксиридилсодержащим промотором *lac UV5* и показал, что σ -субъединица присоединяется к (–3)-нуклеотиду нематричной цепи этого промотора. Хиллел и Ву [9] обнаружили, что как в случае специфического бинарного комплекса полного фермента с ДНК фага T7, так и в случае транскрипционного комплекса, синтезирующего короткие цепи РНК, σ -субъединица контактирует с ДНК. Имеются данные и о взаимодействии индивидуальной σ -субъединицы с ДНК [10].

Взаимодействие σ -фактора РНК-полимеразы с промотором в районе 0-точки, (–10)- и (–35)-нуклеотидов, а также результаты «футпринтирования» позволяют предположить, что субъединицы фермента в комплексе с промотором располагаются таким образом, что σ -фактор имеет с цепью ДНК тесный контакт на всем протяжении промоторной области, тогда как β' - и β -субъединицы располагаются в основном на участке между (–25)- и (+15)-нуклеотидами, что повышает доступность района (–35)-нуклеотида действию нуклеаз. Кроме того, способность σ -субъединицы взаимодействовать не только с промотором, но и с непромоторными участками позволяет сделать вывод, что именно эта субъединица РНК-полимеразы *E. coli* ответственна за узнавание промоторных участков на ДНК.

В настоящее время проводятся исследования по ковалентному связыванию с РНК-полимеразой аналогов промоторной области G2 ДНК бактериофага *fd*, содержащих остатки 5-бромурацила в «плюс»-цепи.

Экспериментальная часть

В работе использованы дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Sigma, США), трис, акриламид и N,N-метиленабисакриламид (Merck, ФРГ), ^{32}P -меченые трифосфаты (Amersham, Англия), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1), фосфодиэстераза селезенки (КФ 3.1.4.1), ДНКазы I (КФ 3.1.4.5) и микрококковая нуклеаза (КФ 3.1.4.7; Worthington, США), ДНК-полимераза *E. coli* I, ДНК-полимераза *E. coli* A и S_1 -нуклеаза *Aspergillus oryzae* (P-L Biochemicals, США). ДНК-полимераза T4, полинуклеотидкиназа T4 и ДНК-лигаза T4 были выделены по методу [11]. Радиоактивность определяли с помощью сцинтилляционного счетчика «Mark II» (Nuclear Chicago, США). $5'$ - ^{32}P -меченые препараты олигонуклеотидов получали с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназы T4 по методу Ричардсона [12].

Связывание комплексов промоторов с РНК-полимеразой на нитроцеллюлозных фильтрах проводили как в работе [2]. Облучение препаратов УФ-светом осуществляли при 20°C тремя лампами БУФ-15 (ртутная лампа низкого давления, мощность 15 Вт) с расстояния 7 см на полоске парафильма (Amer. Can Company, США) в объеме 50–100 мкл. Интенсивность светового потока в этих условиях при 254 нм была определена с помощью уридиновой актинометрии по методу Ванга [13] и соответствовала $40 \cdot 10^3$ эрг/мм²мин.

ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* (полный фермент) была выделена из клеток *E. coli* МРЕ-600 и *E. coli* В по модифицированному методу Бургеса [14], как описано ранее [5].

1. «Фугнтригирование» комплекса промотор–РНК-полимераза осуществляли по модифицированной методике Галаса и Шмитца [3]. Инициаторный комплекс был получен взаимодействием 1 пмоль промотора, меченного по $5'$ -концу «минус»-цепи ($\sim 100\,000$ имп/мин), с 5 пмоль РНК-полимеразы в 100 мкл буфера, содержащего 50 мМ КСl, 20 мМ трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ дитиотреит и 0,1 мМ GTP. Через 10 мин к реакционной смеси прибавляли панкреатическую ДНКазу до концентрации 0,14 мкг/мл и выдерживали 30 с при 20°C . Реакцию останавливали прибавлением 0,25 объема 1 М ацетата натрия, содержащего 0,2 мкл/мл суммарной тРНК, а затем 2 объемов спирта. После охлаждения до -20°C центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин, осадок растворяли в 5 мкл 0,1 М NaOH, прибавляли 5 мкл 50% глицерина, содержащего смесь красителей, помещали на 20% полиакриламидный гель (пластина $20 \times 40 \times 0,1$ см) с 7 М мочевиной и проводили электрофорез при напряжении 1000 В. В качестве свидетелей использовали частичный гидролизат ДНКазой соответствующего промотора и продукты его расщепления гидразином и муравьиной кислотой (соответственно реакции на C+T и A+G при определении последовательности ДНК методом химических модификаций). В случае 5-Br-урацилсодержащего промотора перед нанесением на гель реакционную смесь обрабатывали дополнительно 0,1% додецилсульфатом натрия.

2. Получение модифицированных промоторов методом ограниченного матричного копирования. а. Промотор P1. Соединение химически синтезированных олигодезоксирибонуклеотидов (A) и (B) на ДНК фага fd с помощью полинуклеотидлигазы T4 проводили в инкубационной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ дитиотреит, 0,6 мМ gATP, 1,3 мкМ ДНК фага fd [(+)-нить], 4 мкМ раствор каждого олигонуклеотида и по 48 ед. акт. фермента на 100 мкл. Реакцию проводили при 15°C в течение 4 ч. Ход сшивки контролировали с помощью электрофореза в 20% полиакриламидном геле. Затем в реакционную смесь прибавляли 10 мкмоль «стоппера» (H) на 100 мкл смеси, имеющего на $5'$ - и $3'$ -концах фосфатную группу, $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -меченые (40 Кп/ммоль) dATP, dCTP и dGTP, а также немеченый dBrUTP до концентрации каждого

0,1 мМ и 30 ед. акт. ДНК-полимеразы T4. За прохождением реакции достройки и лигазного сшивания со «стоппером» [1] следили с помощью электрофореза в 10% денатурирующем полиакриламидном геле. Через 1 ч ферменты инактивировали прогреванием при 70° С в течение 5 мин, ДНК осаждали 2 объемами спирта, осадок выделяли центрифугированием, промывали спиртом, растворяли в 100 мкл буфера, содержащего 0,03 М ацетат натрия (рН 5,0), 0,3 М NaCl, 1 мМ ZnCl₂, прибавляли 8 ед. акт. S₁-нуклеазы и выдерживали 1 ч при 20° С. Реакцию останавливали прибавлением EDTA до концентрации 0,05 М. Дуплекс выделяли гель-фильтрацией на биогеле А 1,5 т (колонка 1×50 см) при 4° С в 0,01 М триэтиламиннойбикарбонате, рН 7,5.

6. Синтез модифицированных промоторов PII, PIII и PIV проводили аналогично синтезу промотора PI. Для получения промотора PII в качестве «праймера» брали полинуклеотид (А—С), полученный лигазной сшивкой сегментов А, В и С на ДНК фага fd, в качестве «стоппера» — аналогично синтезированный полинуклеотид (F—H). Достройку проводили в присутствии α-³²P-меченых dATP, dCTP и dGTP и немеченого dBrUTP. После обработки S₁-нуклеазой был получен дуплекс, содержащий остатки бромурацила в положениях -9, -10, -12 и -15 «минус»-цепи.

В синтезе промотора PIII «праймером» служил гексадекануклеотид (А—В'), который сначала удлинняли до 25-звенного полинуклеотида с помощью ДНК-полимеразы и трех дезоксириботрифосфатов dBrUTP, [α-³²P]dCTP и [α-³²P]dATP, а затем после осаждения спиртом, растворения в соответствующем буфере и смены трифосфатов на dTTP, dCTP, dATP и dGTP в присутствии «стоппера» (D—H) и ДНК-полимеразы T4 и ДНК-лигазы T4 проводили элонгацию до 5'-конца сегмента (D) и сшивание со «стоппером». После удаления одноцепочечных участков S₁-нуклеазой был получен промотор PIII, содержащий остатки бромурацила в положениях +3, +4, +5 и -3 «минус»-цепи. Для получения промотора PIV «праймером» служил полинуклеотид (А—E), «стоппером» — полинуклеотид (G—H). Во всех случаях «стопперы» имели на 3'- и 5'-концах цепи фосфатную группу.

3. Получение непромоторного участка ДНК проводили по методу [6]. В качестве «праймера» использовали декануклеотид (I). 0,1 нмоль ДНК фага fd [(+)-нить] отжигали с 1 нмоль «праймера» в 100 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (рН 7,5) и 10 мМ MgCl₂, затем прибавляли α-³²P-меченые dATP, dCTP, dGTP (0,5 мКи) до 0,05 мМ концентрации каждого, dBrUTP (0,2 нмоль) и 10 ед. акт. ДНК-полимеразы *E. coli*. Реакцию проводили при 20° С в течение 15 мин. Элонгированный «праймер» и матрицу отделяли от избытка дезоксириботрифосфатов осаждением спиртом. Обработку S₁-нуклеазой и выделение дуплекса проводили как в опыте 2. Длину полученного полинуклеотида контролировали электрофорезом в 10% полиакриламидном геле.

4. Фотоиндуцированное сшивание РНК-полимеразы с модифицированными промоторами PI—PIV проводили в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl (рН 7,9), 120 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит. 50 мкг (100 пмоль) РНК-полимеразы *E. coli* и 10 пмоль (10·10⁶ имп/мин) меченого промотора инкубировали 10 мин при 37° С в 200 мкл буфера и инкубационную смесь облучали 5—10 мин УФ-светом при 20° С. Затем прибавляли 10 мкг ДНКазы I и 5 мкг фосфодиэстеразы змеиного яда и инкубировали 30 мин при 37° С. После прибавления 1/2 объема 126 мМ трис-HCl (рН 6,8) в 20% глицерине, содержащем 3% додецилсульфата натрия, 5% меркаптоэтанола и 0,002% бромфенолового голубого, смесь прогревали 1—2 мин при 100° С и наносили на пластину (20×20×0,15 см) с 7% полиакриламидным гелем с 0,375 М трис-HCl (рН 8,8) и 0,1% додецилсульфатом натрия. Электрофорез проводили при 30 мА с использованием 3% центрирующего геля, содержащего 0,125 М трис-HCl (рН 6,8) и 0,1%

додецилсульфат натрия. В качестве электродного буфера был взят 0,025 М трис — 0,192 М глицин — 0,1% додecilсульфат натрия. Для определения относительного количества метки в субъединицах фермента гель прокрашивали кумасси, высушивали и радиоавтографировали. Радиоактивные зоны вырезали и просчитывали на счетчике радиоактивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чазмахчева О. Г. Синтез промоторной области ДНК бактериофага *fd*.— Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 138—144.
2. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чазмахчева О. Г., Долганов Г. М., Реввердато С. В. Взаимодействие РНК полимеразы *E. coli* с синтетическими промоторами ДНК бактериофага *fd* in vitro и in vivo.— Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1682—1692.
3. Galas D. J., Schmitz A. DNAase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity.— Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 9, p. 3157—3170.
4. Schaller H., Gray C., Herrmann K. Nucleotide sequence of an RNA Polymerase binding site from the DNA of bacteriophage *fd*.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 2, p. 737—741.
5. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чазмахчева О. Г., Скиба Н. П., Липкин В. М., Модянов Н. Н. Ковалентное связывание РНК полимеразы *E. coli* с фоточувствительными аналогами декатимидиловой кислоты.— Биооргани. химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1410—1424.
6. Sekiya T., Takeya T., Contreras R., Kupper H., Khorana H. G., Landy A. Nucleotide sequence at the two ends of the *E. coli* tyrosine tRNA genes and studies of the promoter.— in: RNA polymerase (eds. Losik R., Chamberlin M.), Cold spring Harbor Lab., 1976, p. 455—472.
7. Okada M., Vergne J., Brahms J. Subunit topography of RNA polymerase (*E. coli*) in complex with DNA.— Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 6, p. 1845—1862.
8. Simpson R. B. The molecular topography of RNA polymerase — promoter interaction.— Cell, 1979, v. 18, № 2, p. 277—285.
9. Hillel Z., Wu C.-W. Photochemical cross-linking studies on the interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with T7 DNA.— Biochemistry, 1978, v. 17, № 15, p. 2954—2961.
10. Stender W. Sequence-specific interaction of subunit of *E. coli* RNA polymerase with DNA.— Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 15, p. 3459—3466.
11. Panet A., Sande J. H., van de Loewen P. Cp., Khorana H. G., Raae A. G., Lillehaug G. R., Kleppe K. Physical characterization and simultaneous purification of bacteriophage T4 induced polynucleotide kinase, polynucleotide ligase, and deoxyribonucleic acid polymerase.— Biochemistry, 1973, v. 12, № 25, p. 5045—5050.
12. Richardson C. C. Phosphorylation of nucleic acid by an enzyme from T4 bacteriophage — infected *Escherichia coli*.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, v. 54, № 1, p. 158—165.
13. Wang S. Y. Analysis of the rate of the ultraviolet irradiation and reconstitution reactions of 1,3-dimethyluracil and uridin.— Photochem. and Photobiol., 1962, v. 1, № 2, p. 135—145.
14. Burgess R. R., Jendrisak J. J. Procedure for the rapid, largescale purification of *Escherichia coli* DNA dependent RNA polymerase involving polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 21, p. 4634—4638.

Поступила в редакцию
31.X.1980

INTERACTION OF DNA DEPENDENT RNA POLYMERASE *E. COLI* WITH ANALOGS OF THE PROMOTER REGION OF BACTERIOPHAGE *fd* DNA CONTAINING 5-BROMOURACIL RESIDUES IN THE TEMPLATE STRAND

ОВЧИННИКОВ Ю. А., ЕФИМОВ В. А., ШАХМАКЧЕВА О. Г.,
СКИБА Н. П., ЛИПКИН В. М.

М. М. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

Four photosensitive analogs of promoter region G2 of phage *fd* DNA having 5-BrdU residues in different positions of the minus (template)-strand have been obtained. It was shown that ultraviolet irradiation induces the formation of stable covalently bound complexes of *E. coli* RNA polymerase with these modified polynucleotides. The formation of crosslinks between the enzyme and the bases in «Pribnow box», the re-

gion of (-35)-nucleotide and near the starting-point of transcription was observed. The promoters were attached specifically to σ -subunit and to one of the large subunits, i. e. β' or β . α -Subunit was essentially not involved in binding of the promoters. The covalent binding of RNA polymerase to the non-promoter region of phage *fd* DNA (3'-end fragment of gene II), in which all thymines in the minus-strand were substituted for bromouracil, was also carried out. In this case modified DNA was mainly covalently bound to σ -subunit of RNA polymerase and in small amounts to α -subunit and a large subunit. The ability of σ -subunit to form specific contacts with functionally important sites of promoter and with non-promoter region indicates that this subunit is really responsible for recognition of promoters on DNAs.
