



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.04

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* С p_0 -ПРОМОТОРОМ
БАКТЕРИОФАГА λ

Свердлов Е. Д., Шак В. Н., Сарафанов А. Г.

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

При взаимодействии промоторов с РНК-полимеразой *E. coli* субъединицы фермента вступают в контакт с определенными парами оснований ДНК. Одним из методов изучения таких контактов является сравнение результатов метилирования самого промотора и его комплекса с РНК-полимеразой диметилсульфатом [1]. Предполагается, что основания, вступающие в процессе комплексообразования в контакт с определенными группами белка, изменяют свою реакционную способность. Проведенное недавно сравнение промоторов *lacUV5* и АЗ бактериофага Т7 в составе комплексов с РНК-полимеразой показало лишь частичное совпадение контактирующих оснований. В данной статье приводятся результаты по влиянию комплексообразования РНК-полимеразы с промотором p_0 бактериофага λ , на котором происходит инициация синтеза короткой *оор* РНК [2], на метилирование нематричной цепи промотора в различных условиях.

Результаты изучения транскрипции ДНК фага λ и ее фрагментов *in vitro* [3] свидетельствуют о том, что p_0 является одним из сильных промоторов. Он имеет высокую степень гомологии с промотором АЗ фага Т7 в области -35 . 5'-Концевая последовательность иницируемой на нем РНК — GUUGA. Ранее нами был проклонирован *EcoRI*-G-фрагмент ДНК фага *limm434* [4], содержащий промотор p_0 . Карта расщепления этого фрагмента рестрикционными эндонуклеазами приведена на рис. 1. Чтобы получить p_0 -промотор, меченный только по нематричной цепи, *EcoRI*-G-фрагмент расщепляли эндонуклеазой *Bgl* II, дефосфорилировали и затем метили ^{32}P с помощью $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{АТР}$ и Т4-полинуклеотидкиназы. Далее ^{32}P -меченный фрагмент расщепляли рестриктазой *Hind*II. Полученный таким образом меченный по одной цепи промотор p_0 использовали для комплексо-

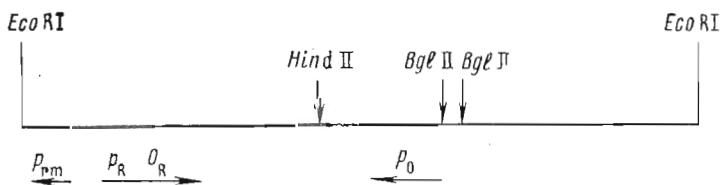


Рис. 1. Карта расщепления фрагмента *EcoRI*-G фага *limm434* рестрикционными эндонуклеазами *Bgl*II и *Hind*II. Стрелкой указано начало и направление транскрипции, иницируемой на промоторе p_0

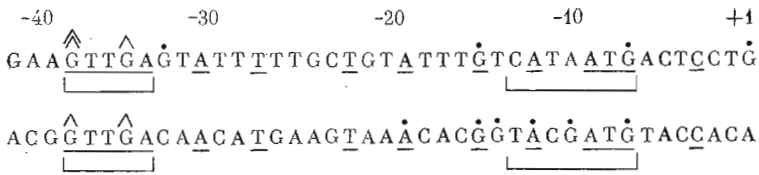


Рис. 2. Влияние комплексообразования с РНК-полимеразой на скорость метилирования гуанозиновых звеньев в промоторе АЗ бактериофага Т7 (внизу) и промоторе р₀ (вверху) бактериофага λ. Метилирование отмеченных точкой G блокируется при образовании комплекса. Λ над символом обозначает ускорение метилирования. Подчеркнуты бокс Прибнова и область -35

образования с РНК-полимеразой *E. coli* и последующего метилирования диметилсульфатом в составе комплекса в условиях предпочтительного метилирования G. Модифицированную ДНК расщепляли по метилированным основаниям по методу Максама — Гилберта. Полученный набор меченных ³²P-концевых олигонуклеотидов фракционировали по длине в полиакриламидном геле и относительное содержание каждого олигонуклеотида оценивали по интенсивностям соответствующих полос на рентгеновской пленке после радиоавтографии. Увеличение или уменьшение интенсивности определенной полосы свидетельствовало о повышении или понижении относительного содержания данного олигонуклеотида в смеси и, следовательно, об увеличении или уменьшении скорости метилирования по соответствующему гуанозиновому звену. При этом наблюдали как повышение, так и понижение относительной интенсивности полос в опыте по сравнению с контролем. Результаты метилирования комплекса РНК-полимеразы с р₀ в стандартных условиях [1] суммированы на рис. 2. Экспериментальные данные по влиянию РНК-полимеразы на метилирование промотора р₀ аналогичны результатам, полученным для промотора АЗ бактериофага Т7, т. е. наблюдается увеличение относительной интенсивности полос, соответствующих G(-37) и G(-34) и уменьшение интенсивностей полос G(-7) и G(-15). При обработке комплексов РНК-полимеразы с промотором р₀ диметилсульфатом замедляется также метилирование G(-32). Это звено отсутствует в промоторах АЗ и *lacUV5*. Оно находится в области относительно высокой консервативности [1], которая, возможно, существенна для взаимодействия с РНК-полимеразой.

Влияние условий комплексообразования на взаимодействие РНК-полимеразы *E. coli* с промотором р₀ бактериофага в области G(-37)

Варьируемый фактор	Условия комплексообразования				
	1	2	3	4	5
Температура	-	-	+	+	+
Ионная сила	+	+	+	-	-
Нуклеозидтрифосфаты	+	+	+	-	-
	+	+			
	+	+			

Примечание. Комплексообразование РНК-полимеразы с промотором р₀ проводили в использованном стандартных условиях [1]: 37° С, ионная сила 0,15 М, концентрация нуклеозидтрифосфатов 0,20 мМ. При этом в каждой серии опытов варьировали лишь один из трех вышеуказанных факторов. Условия комплексообразования 1—5 соответствуют следующим значениям варьируемых факторов: для температур — 0, 10, 20, 30, 37° С; для ионной силы — 0,15; 0,20; 0,25; 0,3; 0,35 М КСl и для концентраций нуклеозидтрифосфатов (NTP) — 0; 0,2 мМ GTP; 0,2 мМ GTP + 0,2 мМ UTP; 0,2 мМ GTP + 0,2 мМ UTP + 0,2 мМ ATP; все четыре NTP в концентрации 0,2 мМ каждый. + + +, — означают сильное повышение, заметное повышение, слабое повышение и отсутствие отличий в интенсивности полосы G(-37) при метилировании комплексов промотора р₀ с ферментом по сравнению с контролем.

Особенно сильное влияние РНК-полимераза оказывает на метилирование G(-37), для которого наблюдается значительное увеличение скорости метилирования. Этот эффект легко определяется визуально, и мы использовали его для оценки влияния условий на взаимодействие РНК-полимераза с промотором. В качестве факторов, влияющих на такое взаимодействие, исследовали температуру, ионную силу раствора и присутствие различных сочетаний нуклеозидтрифосфатов, обеспечивающих инициацию и синтез РНК.

Полученные результаты сведены в таблицу. Можно видеть, что при повышении ионной силы эффект увеличения интенсивности наблюдаемой полосы постепенно ослабевает и перестает проявляться при $\mu=0,25$. Следовательно, комплекс РНК-полимераза с промотором p_0 является сравнительно устойчивым к действию солей. Ускорение метилирования G(-37) не зависит от присутствия одного иницирующего нуклеозидтрифосфата ГТР. Это означает, что добавление в реакционную смесь ГТР не приводит к значительным конформационным перестройкам внутри комплекса промотора с ферментом. При добавлении двух нуклеозидтрифосфатов ГТР и УТР возможен синтез тетрауклеотида GUUG и более коротких продуктов [5]. При этом происходит заметное ослабление контакта РНК-полимераза с G(-37) промотора p_0 , судя по изменению скорости метилирования данного основания. Согласно экспериментальным данным, контакт фермента с G(-37) промотора еще наблюдается в присутствии трех нуклеозидтрифосфатов (ГТР, УТР и АТР), когда уже становится возможным синтез декануклеотида, и исчезает при добавлении всех четырех субстратов. Интересно и то, что при инициации синтеза РНК не обнаруживается новых контактов между РНК-полимеразой и основаниями промотора.

При понижении температуры также наблюдается ослабление вышеописанного эффекта, причем минимальная температура, при которой он еще наблюдается, равна 20° С. Мы исследовали зависимость инициации синтеза РНК на промоторе p_0 от температуры и нашли, что эффективная инициация начинается в интервале температур между 10 и 20° С. Можно предположить, что РНК-полимераза вступает в контакт с G(-37) только после образования открытого комплекса, которое начинается в этом температурном интервале.

Следует отметить, что при метилировании комплекса РНК-полимераза с промотором не было обнаружено качественных различий в относительных интенсивностях полос при разных температурах [6]. Причины расхождения наших результатов и результатов [6] неясны, и вряд ли объясняются различием свойств промоторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. Cell, 1980, v. 20, № 2, p. 269-281.
2. Hayes S., Szybalsky W. Mol. Gen. Genet., 1973, v. 126, № 2, p. 275-290.
3. Свердлов Е. Д., Монастырская Г. С., Росланов В. М. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 7, с. 894-900.
4. Sverdlov E. D., Hodkova E. M., Patruschev L. I., Shemyakin M. F. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1979, B. 360, № 8, S. 1046.
5. Свердлов Е. Д., Царев С. А. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1110-1113.
6. Kovacic R. T., Wang J. C. Fed. Proc., 1980, v. 39, № 6, p. 1654.

Поступило в редакцию
9.III.1982

FACTORS AFFECTING THE *E. COLI* RNA POLYMERASE INTERACTION WITH
 λ PHAGE p_0 PROMOTER

SVERDLOV E. D., PACK V. N., SARAFANOV A. G.

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

The effect of interaction of *E. coli* RNA polymerase with the λ phage p_0 promoter on its nontemplate strand modification with dimethylsulfate has been investigated. The guanosine residues -7, -15, -32, -34 and -37 were identified as the points of close approaches of the RNA polymerase to the promoter. Strong enhancement of the G (-37) methylation rate in the enzyme-promoter complex was observed at the temperatures above 10° C and KCl concentrations below 0,25 M. Initiating triphosphate GTP, when taken alone, exerted no influence, but the effect became less pronounced when GTP+UTP or GTP+UTP+ATP were added; the simultaneous presence of GTP, UTP, ATP and CTP abolished the effect.