

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*

© 2002 г.

М. В. ХОРЕТОНЕНКО,

Е. А. РУДАКОВА, М. Г. ИВАНОВСКАЯ

*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В.Ломоносова*

I. Введение. II. Механизм инициации транскрипции в клетках *E. coli*. III. Рентгено-структурный анализ в изучении РНК-полимеразы *E. coli*. IV. Спектральные методы изучения комплексов РНК-полимеразы с ДНК-промотором. V. Микроскопия. VI. Олигонуклеотиды как инструменты для изучения РНК-полимеразы. VII. Химический и ферментативный гидролиз комплексов РНК-полимеразы с промотором. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Один из главных вопросов современной молекулярной биологии — изучение процесса экспрессии генов в клетках различных организмов. Понимание механизмов реализации генетической информации, синтеза РНК и белка уже сейчас является базой для развития работ по направленному воздействию на генетический аппарат клетки и важно не только с точки зрения фундаментальных исследований. Знание биохимических принципов генетической экспрессии может позволить создать терапевтические препараты, действующие на клеточном уровне и позволяющие лечить генетически обусловленные заболевания.

Ключевым этапом экспрессии генетического материала в клетках является транскрипция. Стадия узнавания и инициации транскрип-

Принятые сокращения: РНКП — РНК-полимераза *E. coli*; РСА — рентгено-структурный анализ; НОВТ — N-оксибензотриазол; ТЗП — межнуклеотидная тризамещенная пирофосфатная группа; FeBAVE — (S)-1-(p-бромацетамидобензил)-этилендиаминтетраацетат железа.

Адрес для корреспонденции: e-mail: img@genebee.msu.su

Работа поддержана грантами РФФИ № 99–03–33127а, № 02–03–32950, № 01–03–06325 (МАС), № 01–03–06324 (МАС), а также грантом РФФИ «Ведущие научные школы» № 00–15–97944.

ции — основная мишень для регуляции транскрипции, поэтому изучение этой стадии является основным объектом многих исследований. Однако изучение процесса транскрипции в эукариотических клетках затруднено из-за сложности самого механизма транскрипции у эукариот и его моделирования. Основополагающим для установления функциональных и структурных особенностей транскрипционного цикла является знание структуры РНК-полимераз — ферментов, отвечающих за транскрипцию. При этом весьма удобной моделью для их изучения служат РНК-полимеразы прокариотических организмов, поскольку они имеют выраженное структурное сходство с РНК-полимеразой эукариот и в то же время способны работать *in vitro*.

В настоящее время накоплено много сведений о различных прокариотических РНК-полимеразах. Самым мощным методом изучения структуры белково-нуклеиновых комплексов является на сегодня рентгено-структурный анализ (РСА), позволяющий изучать структуры белков и их комплексов с НК с разрешением до 2 Å. Однако недостаток этого метода заключается в необходимости получения кристаллов исследуемых веществ, что достаточно сложно, особенно для мультисубъединичных белков, к которым относятся РНК-полимеразы. Для комплексов РНК-полимераза-ДНК, структура которых не расшифрована методом РСА, судить о структурной организации приходится на основании данных альтернативных методов или экстраполируя данные РСА фрагментов белка вне комплекса с ДНК. Эти данные получают с использованием таких методов, как мутагенез, различные виды микроскопии и спектроскопии, ковалентное связывание РНК-полимеразы с ДНК.

В настоящем обзоре рассмотрены основные физико-химические и биохимические подходы к изучению инициации транскрипции в прокариотах — РСА, футпринтинг, химический гидролиз ДНК и белка, получение ковалентно связанных комплексов, комплексообразование, флуоресцентные и электронно-микроскопические методы. Методы рассматриваются на примере РНК-полимеразы *E. coli* (РНКП) — фермента, который в последние десятилетия активно изучается во многих лабораториях мира. Для каждого рассмотренного метода будут приведены некоторые результаты, полученные с его помощью, а также ограничения и перспективы. На основании данных, полученных различными методами, изложены современные представления о механизме инициации транскрипции.

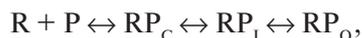
II. МЕХАНИЗМ ИНИЦИИИ ТРАНСКРИПЦИИ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Ферментом, ответственным за транскрипцию в бактериальных клетках, является РНК-полимераза. РНК-полимераза *E. coli* состоит из шести субъединиц — двух α (329 аминокислотных остатков (а/к), молекулярная масса ≈ 37 кДа), β (1342 а/к и 151 кДа), β' (1407 а/к и 155 кДа), ω (90 а/к и ≈ 10 кДа) и σ^{70} (613 а/к и 70 кДа). Пять из них — 2α , ω , β и β' — образуют кор-фермент, ответственный за стадию элонгации транскрипции. На стадии инициации транскрипции кор-фермент взаимодействует с σ -субъединицей, образуя холо-фермент [22, 45, 62].

Предполагается, что первоначально холо-РНКП взаимодействует с ДНК неспецифически, после чего начинает перемещаться вдоль нее в поисках промотора [2, 32, 51]. В некоторых работах есть указания на то, что первой в составе промотора узнается консенсусная последовательность в -35 -области относительно сайта начала транскрипции [16]. Далее фермент образует довольно прочный комплекс с областью -10 относительно сайта начала транскрипции [45]. Области -35 и -10 , ответственные за связывание РНКП с промотором, содержат консенсусные последовательности TTGACA и TATAAT, соответственно. Необходимо отметить, что в состав холо-РНКП может входить не только σ^{70} -субъединица, но и другие σ -факторы (например, σ^{54} , σ^N), отличающиеся от σ^{70} . Так что упомянутая выше структура сайтов узнавания характерна для промоторов, транскрипция которых иницируется с помощью σ^{70} -субъединицы. Для промоторов, инициация транскрипции которых зависит от других σ -факторов, характерна другая первичная структура. К настоящему времени исследовано влияние каждого нуклеотида в участке -10 на силу промотора [49]. Также показана важность спейсерного участка, разделяющего области -10 и -35 . Установлено, что оптимальная длина спейсера составляет 16–18 нуклеотидных пар [26]. Показано, что некоторые промоторы содержат динуклеотид TG (так называемый TG-элемент), расположенный непосредственно справа за -10 -областью. Функции такой удлиненной -10 -области заключаются в обеспечении транскрипции с участием σ^{70} в отсутствие -35 -области [40]. В некоторых сильных промоторах рибосомных генов обнаружен еще один район, определяющий взаимодействие промотора с α -субъединицей РНКП [18, 59].

После образования прочного «закрытого» комплекса между РНКП и -10 -областью промотора в районе между позициями -12 и $+1$ относительно сайта начала транскрипции происходит локальное плавление ДНК [45]. Таким образом, «закрытый» промоторный комп-

лекс переходит в «открытый». В принципе, весь процесс взаимодействия холо-РНК-полимеразы с промотором можно представить схемой:



где R — холо-фермент, P — промотор, RP_C — «закрытый» комплекс, который затем через серию промежуточных состояний RP_I переходит в «открытый» комплекс RP_O .

Далее фермент, содержащий расплетенную ДНК, продвигается по цепи к сайту начала транскрипции, и начинается стадия abortивной инициации — синтез коротких (от 8 до 11 нуклеотидных пар) олигорибонуклеотидов, которые не образуют прочного тройного комплекса — фермент—ДНК—рибоолигонуклеотид — и диссоциируют из него. При достижении этими олигорибонуклеотидами длины 11—12 нуклеотидов в комплексе РНКП—ДНК происходят конформационные изменения, в частности, уход σ -субъединицы, прекращается диссоциация РНК-продукта, и процесс переходит в стадию процессивной элонгации.

Общая концепция, изложенная выше, разработана на основе данных, полученных различными физико-химическими, биохимическими, генетическими и молекулярно-биологическими методами. Однако многие детали, касающиеся структуры и функционирования промоторного комплекса РНКП-ДНК, остаются невыясненными. Поэтому в настоящее время промоторный комплекс РНКП детально изучается во многих лабораториях мира с применением различных подходов и методов.

Далее рассмотрены методы изучения комплекса РНКП с ДНК-промотором на стадии узнавания и инициации транскрипции, широко используемые в настоящее время.

III. РЕНТГЕНО-СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ В ИЗУЧЕНИИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*

Данных РСА для комплекса РНКП с промотором пока не существует. Принимая во внимание большие размеры фермента и склонность комплекса к разнообразным перестройкам, можно ожидать, что в ближайшее время кристаллы таких комплексов для РСА не будут получены.

По этой причине для моделирования комплексов РНКП с ДНК используют данные, полученные при помощи альтернативных биохимических и физико-химических методов, а также данные РСА для отдельных фрагментов РНКП. Так, протеолиз σ^{70} -субъединицы РНКП позволил установить ее доменную организацию [64]. Тогда же с помощью РСА была установлена кристаллическая структура фрагмента σ^{70} -субъединицы. Данный фрагмент был получен путем протео-

лиза полноразмерной σ^{70} и представлял собой один домен (114—448 а/к), включающий часть консервативного района 1.2 и консервативный район 2. Этот домен обладал способностью связывать кор-РНКП, конкурируя с нативной σ^{70} -субъединицей, а образующийся белковый комплекс был способен связывать одноцепочечную ДНК, содержащую консенсусную последовательность области –10 промотора. Была получена модель кристаллической структуры фрагмента с разрешением 2,6 Å [64]. Эта модель была соотнесена с данными мутационного анализа комплекса σ^{70} -субъединицы с промотором. Такое соотнесение показало, что аминокислотные остатки, по данным мутационного анализа включенные во взаимодействие с кор-РНКП, расположены на одной стороне структуры. С противоположной стороны расположены остатки, отвечающие за взаимодействие с гетероциклическими основаниями консенсусной области –10 промотора. Была предложена модель структурных перестроек σ^{70} -субъединицы, при которых после связывания с кор-РНКП она становится способной специфически связывать промотор, в то время как изолированная σ^{70} -субъединица на это не способна [64].

Во многих последующих работах, касавшихся изучения структуры комплекса РНКП с промотором, авторы сопоставляли полученные данные с этой моделью кристаллической структуры [64]. Однако подобное сопоставление нельзя считать достаточно обоснованным, поскольку говорить о прямых корреляциях между данными РСА для изолированной σ^{70} -субъединицы и данными, полученными в растворе для комплекса σ^{70} с ДНК, нельзя.

В 1999 г. был получен кристалл кор-РНК-полимеразы *Thermus aquaticus* [77]. После проведения РСА с разрешением 3,3 Å была описана его структура с учетом полученной ранее методом электронной микроскопии структуры кор-РНКП [25]. По данным РСА, в структуре кор-РНК-полимеразы *T. aquaticus* присутствует внутренний канал шириной 27 Å. Расположенный на задней поверхности этого канала ион Mg^{2+} , необходимый для каталитического действия фермента, хелатирован абсолютно консервативным для всех про- и эукариотических РНКП участком аминокислотной последовательности. Определенные методами мутаций и ковалентного связывания фрагменты белка, необходимые для формирования активного центра, расположены на внутренней поверхности канала вблизи иона Mg^{2+} [77]. В этой работе предложена схема взаимодействия расплетенного промотора и образующегося РНК-продукта с кор-ферментом РНК-полимеразы *T. aquaticus* [77].

Недавно методом рассеяния рентгеновских лучей в растворе были получены структурные данные для σ^{54} -субъединицы РНКП. Было установлено «бумеранг»-подобное строение этой субъединицы, а также

предположительно определены ДНК-связывающие участки поверхности. При этом авторы отмечают, что несмотря на значительное различие первичных структур σ^{54} и σ^{70} , эти две субъединицы, по всей видимости, имеют определенное структурное сходство [69]. Сравнивая эти два метода — РСА и метод рассеяния рентгеновских лучей, можно сказать, что неоспоримым преимуществом первого является более высокое разрешение и четкость получаемой структуры, однако РСА ставит серьезное ограничение — необходимость получения кристаллов белка. Преимущества второго метода — возможность изучения белка в растворе, то есть в его наиболее близкой к природной форме.

IV. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ С ДНК-ПРОМОТОРОМ

Важное место среди подходов к исследованию инициаторного комплекса занимают флуоресцентные методы. В частности, в σ^{70} -субъединице РНКП *E. coli* было показано, что при замене Trp на 5-ОН-Trp, являющийся флуорофором, в позициях 433 и 434 наблюдается значительное тушение флуоресценции при формировании холофермента и последующем образовании комплекса с фрагментом нематричной цепи промотора. Изменение интенсивности флуоресценции свидетельствует в данном случае о том, что молекула белка, содержащая в своем составе флуорофор, претерпевает определенные конформационные изменения или участвует в образовании комплекса. В результате флуорофорная группа оказывается закрыта или вовлечена во взаимодействие с другими группами комплекса, вследствие чего и происходит тушение флуоресценции. Отсюда был сделан вывод о том, что эти два аминокислотных остатка расположены в области связывания одноцепочечной ДНК и что связывание σ^{70} с кор-ферментом индуцирует конформационные изменения в этой области [21].

Наряду с включением флуоресцентной метки в состав белка существует ряд подходов к изучению инициаторного комплекса, связанных с использованием флуоресцентного мечения олигонуклеотидов. Так, например, были использованы олигонуклеотиды, содержащие в качестве флуоресцентной группы 2-аминопурин [28]. Связывание фермента с модельным флуоресцентно меченным дезоксирибоолигонуклеотидом, содержащим –10-область промотора, наблюдали по возрастанию флуоресценции. Было установлено, что влияние ионной силы раствора на образование и диссоциацию комплекса относительно невелико. Также был обнаружен значительный тепловой эффект реакции связывания (1–2 ккал/моль·К), свидетельствующий, очевидно, о конформационных изменениях в РНКП. С помощью

таких модельных соединений были определены константы ассоциации и кинетические константы образования инициаторного комплекса РНК-полимеразы с олигонуклеотидами. Константа ассоциации составила $5 \pm 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ и понижалась при внесении мутаций в последовательность промотора, константа скорости реакции ассоциации — $7 \pm 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, константа скорости реакции диссоциации — $0,4 \pm 0,2 \text{ с}^{-1}$. При этом кинетическая константа ассоциации также уменьшалась при внесении мутаций в промотор, в то время как кинетическая константа диссоциации повышалась. Важным был результат, демонстрирующий, что константа связывания РНКП с олигонуклеотидами длиной 10–12 нуклеотидов в 10 раз ниже, чем для полноразмерного промотора. По мнению авторов это связано с тем, что нативный промотор способен ускорять необходимые конформационные перестройки в РНКП [28].

Для изучения термодинамических особенностей взаимодействия РНКП с промотором использовался метод поляризации флуоресценции. При этом флуорохромная группа вводилась в состав ДНК. Так, в работе [35] с помощью этого метода, а также с использованием КД-спектроскопии, были установлены особенности взаимодействия димера α -субъединиц РНКП с промотором. В частности, было показано, что данный димер взаимодействует с ДНК по так называемой «жесткой» модели (без конформационных изменений), не вступая в какие-либо специфические комплементарные взаимодействия.

С помощью флуоресцентных методов изучают и взаимодействие активаторов транскрипции с инициаторным комплексом. Так, было показано, что активатор транскрипции белок NtrC, взаимодействующий с холо-РНКП, в состав которой входит σ^{54} -субъединица, способен связывать сразу два ДНК-дуплекса [57]. Это позволило предложить конформационную модель взаимодействия РНКП и NtrC в процессе активации. Данные были получены методом двухцветной флуоресцентной кросс-корреляционной спектроскопии. При этом в состав ДНК вводятся два флуорофора — 6-карбоксифлуоресцеин и 6-карбокси-X-родамин. Каждая из красок вводится в один из дуплексов и не вводится в другой.

Среди хорошо известных и традиционных методов следует упомянуть и метод атомно-абсорбционной спектроскопии. С его помощью было установлено, что каждая молекула РНКП связывает два атома двухвалентного цинка [65].

Совсем недавно при изучении резонансного переноса энергии возбуждения флуоресценции (FRET — fluorescence resonance energy transfer) был установлен принципиально важная деталь механизма действия РНКП. В отличие от общепринятого представления, σ^{70} -субъединица, отвечающая за инициацию транскрипции, не

уходит, а остается в составе транскрипционного комплекса на этапе элонгации. Это было установлено путем введения двух флуорофоров в структуру транскрипционного комплекса: донора энергии на 5'-конец ДНК, а акцептора энергии — в структуру σ^{70} по специально введенному остатку цистеина [50]. На основании полученных данных авторы делают важный вывод о том, что прежде существовавшее мнение о принципиальной разнице в механизмах элонгации и инициации неверно, так как нет разницы в субъединичном составе аппарата, отвечающем за инициацию и элонгацию. Предложенный авторами метод позволяет описать движение любой молекулы по любой НК и проанализировать кинетику их взаимодействия. Одновременно вывод о сохранении σ^{70} в составе элонгационного комплекса был подтвержден методом фотокросслинка [12].

При исследовании резонансного переноса энергии возбуждения в один из участников взаимодействия, например в белок, вводится определенный флуорофор-донор, присоединяющийся по заранее известному остатку аминокислоты. В частности, используют мутантные белки, содержащие одиночный цистеин, к которому присоединяют флуорохромную группу. Акцепторный флуорофор помещают на 3'- или 5'-конец олигонуклеотида. По изменению флуоресценции можно судить об образовании комплекса олигонуклеотид-РНКП, а также о его структуре. В частности, после определения расстояния от 3'- и 5'-концов олигонуклеотида до области белка, соседней с областью, ответственной за связывание одноцепочечной ДНК, было установлено, что ДНК должна связываться с РНКП в определенной ориентации — 5'-конец олигонуклеотида направлен в ту же сторону, что и СООН-конец α -спирали 14 консервативного региона 2.4. Так как олигонуклеотид из нематричной цепи промотора, предположительно, первым связывается с участком узнавания ДНК в σ^{70} , то олигонуклеотид из матричной цепи уже не может принять необходимую ориентацию и, как следствие, связывается гораздо хуже. Также были измерены расстояния от 3'- и 5'-концов олигонуклеотида до области 4.2 σ^{70} , предположительно ответственной за связывание —35-области промотора. Из полученных данных был сделан вывод, что модельный олигонуклеотид расположен не параллельно линии, соединяющей участки 2.4 и 4.2 σ -субъединицы. По всей видимости, цепь промотора в открытом комплексе изогнута, и поэтому образование открытого комплекса предусматривает значительные конформационные изменения в ДНК. Также следует отметить, что расстояния, полученные с помощью метода резонансного переноса энергии возбуждения [34], практически совпадают с данными рентгено-структурного анализа для σ^{70} -субъединицы [64].

Флуоресцентные методы исследования переноса энергии между флуорофорными группами, отличающимися по спектрам поглощения и испускания, характеризует высокая чувствительность. Они удобны для установления деталей структуры комплекса РНКП с промотором и позволяют изучать эти комплексы в растворе, без изменения их нативной конформации. Эти методы хорошо отработаны, а реагенты широко доступны.

К спектральным методам изучения взаимодействия РНК-полимеразы с промотором можно отнести и метод спиновой метки. Он заключается во введении в определенные места ДНК заместителя, несущего неспаренный электрон, что позволяет измерять изменение электронного парамагнитного резонанса одиночной ДНК при ее взаимодействии с промотором. Была показана возможность избирательного введения спиновой метки в легкоплавкие участки ДНК на примере ДНК фага T2. При этом легкоплавкие участки ДНК расположены на некотором расстоянии от промоторного участка, что позволяет использовать подобную матрицу для изучения взаимодействия РНКП и промотора. Корректность использования подобной модифицированной ДНК была также подтверждена совпадением температур плавления и величины гиперхромного эффекта у модифицированной и немодифицированной ДНК. Наблюдение ЭПР-спектров позволило построить несколько моделей взаимодействия РНКП с промотором [3]. Согласно первой модели ДНК изгибается, образуя петлю, в основании которой находится молекула РНК-полимеразы. Вторая предполагает скольжение РНК-полимеразы вдоль ДНК. Третья описывает индуцированное последовательное присоединение нескольких молекул РНК-полимеразы к ДНК, а четвертая модель — распространение локального конформационного возмущения вдоль ДНК, индуцируемого РНК-полимеразой. Надо отметить, что для последней модели было разработано математическое описание механизма, основанное на использовании системы нелинейных дифференциальных уравнений. Безусловно, все эти модели носят обобщающе-схематический характер. Но собранные вместе, они показывают принципиально разные подходы в объяснении дальнедействующих взаимодействий в ДНК. Полученные результаты предполагают также возможность дальнейшего применения метода спиновой метки для изучения комплексов РНКП-ДНК, образующихся на стадии инициации транскрипции [3].

Сравнительно недавно появились данные по изучению комплексов РНКП с промотором и некоторыми белковыми факторами с помощью ЯМР. Так, в работе [74] предложена схема взаимодействия α -STD (карбокситерминального домена α -субъединицы) с UP-эле-

ментом ДНК. Показано, в частности, что белок взаимодействует с малой дорожкой ДНК. Ранее с помощью метода ЯМР была установлена структура α -NTD (аминотерминального домена α -субъединицы) в растворе [54]. Установлено, что в состав данного фрагмента белка входят 3 α -спиральных фрагмента и 2 β -листа.

В заключение хотелось бы отметить, что применение различных спектральных методов изучения взаимодействия РНК-полимеразы с ДНК, бесспорно, является крайне многообещающим при исследовании структур белково-нуклеиновых комплексов. Несмотря на некоторые недостатки этих методов (в основном связанные с необходимостью введения крупных флуорофорных либо спин-меченых групп) подобный подход должен прояснить многие аспекты образования инициаторного транскрипционного комплекса, особенно принимая во внимание недостаточное количество данных РСА.

V. МИКРОСКОПИЯ

Появляется все больше работ, связанных с изучением инициации транскрипции микроскопическими методами. В данном разделе речь пойдет о последних достижениях в этой области.

Относительно недавно в практику исследователей вошел новый подход — метод флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения [33]. Он позволяет, фиксируя оба конца ДНК, наблюдать взаимодействие одиночной молекулы РНКП с одиночной цепью ДНК в реальном времени. При этом флуоресцентная метка вводится в РНКП. На обоих концах ДНК закрепляют микрозерна, модифицированные стрептавидином. Далее эту конструкцию определенным образом фиксируют на поверхности стекла, с которой РНКП связывается слабо. Управляют этими зернами с помощью специальных оптических ловушек. Наблюдение проводят с помощью флуоресцентного микроскопа полного внутреннего отражения, специально адаптированного для подобной процедуры. Используют инфракрасный лазер. Луч лазера пропускают через четверть-волновую пластину, которой предшествует поляризирующий делитель. Один из получившихся лучей отклоняется с помощью ортогонально расположенных сканеров, управляемых компьютером. Микрозерна подсвечиваются инфракрасным светом. Делитель лучей необходим для получения двух изображений — на камеру и на специальный фотодиод для постоянного измерения жесткости конструкции. Само флуоресцентное «изображение» улавливается с помощью специальной камеры, спаренной с усилителем изображения, а затем фиксируется на видеопленку. С помощью этого метода было установлено, что на ДНК

фага λ молекулы РНКП предпочтительно связываются в АТ-богатых районах. Было обнаружено два участка медленной диссоциации комплекса, соответствующих промоторной и псевдопромоторной области, содержащей похожую на промотор последовательность. Также были установлены константы устойчивости для областей быстрой и медленной диссоциации комплекса. Достоинство этого метода заключается в том, что он может использоваться для изучения других регуляторных и ДНК-связывающих белков — таких, как различные σ -факторы или, например, эндонуклеазы либо геликазы.

Необходимо отметить метод криоэлектронной микроскопии, в котором исследуемый образец находится в замороженном состоянии, что позволяет фиксировать определенную конформацию белка. Этим способом были получены данные о структуре кор-фермента РНКП и холо-РНКП, в состав которой входила σ^{70} -субъединица [29]. В этой же работе предлагается модель расположения σ^{70} в составе холо-фермента.

Важным инструментом изучения взаимодействия РНКП с ДНК в динамике становится сейчас сканирующий силовой микроскоп. В работе [32] авторы установили, что суть разрушения неспецифических комплексов РНКП-ДНК гепарином заключается в том, что он останавливает скольжение фермента по ДНК. Также была определена скорость синтеза РНК на ДНК-матрице, иммобилизованной на стеклянной подложке, составляющая 15 нуклеотидов в секунду.

Методом атомно-силовой микроскопии, в дополнение к результатам биохимических исследований, было окончательно подтверждено предположение, что ДНК «закручивается» вокруг открытого комплекса РНКП-ДНК [59]. Было установлено, что две трети ДНК, «обмотанной» вокруг открытого комплекса, составляют фрагмент, расположенный в сторону 5'-конца ДНК, а оставшаяся треть — фрагмент, расположенный в сторону 3'-конца ДНК. На основании полученных данных авторы предложили модель открытого комплекса ДНК во взаимодействии с холо-РНКП, содержащей σ^{70} -субъединицу.

Этим же методом изучали активные молекулы РНКП, иммобилизованные на золотой подложке [71]. Было показано, что в условиях эксперимента молекулы РНКП способны синтезировать полноразмерную РНК. В качестве матрицы использовалась циклическая ДНК.

Достоинство всех микроскопических методов заключается в отсутствии необходимости получения кристаллов. Однако определенные искажения во взаимодействия все же вносятся, поскольку микроскопические исследования предполагают расположение образцов на какой-либо поверхности, а зачастую и иммобилизацию молекул на ней. Также определенное воздействие в случае электронно-микроско-

пических методов (особенно это касается сканирующей микроскопии) вносит микроскоп, превращающийся из стороннего инструмента исследования в «участника эксперимента». Тем не менее, важным достоинством ряда микроскопических методов является возможность установления структуры комплекса РНКП–ДНК, что пока не под силу методу РСА. Достоинство других заключается в наблюдении динамики процесса транскрипции в реальном времени.

VI. ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

С появлением методов автоматического синтеза олигонуклеотиды стали важнейшим инструментом для изучения взаимодействия различных белков с ДНК. Не стала исключением и РНКП. Подход, связанный с использованием синтетических олигонуклеотидов в изучении инициаторного комплекса РНКП с промотором, в последнее десятилетие развивается очень интенсивно. Практически каждое исследование функций либо структуры этого фермента так или иначе включает применение синтетических олигонуклеотидов. Ниже рассмотрены особенности применения олигонуклеотидов как моделей промотора для изучения комплекса РНКП с бактериальным промотором *lacUV5*.

Синтетические олигонуклеотиды, первичная структура которых задается направленно, позволяют моделировать определенные более или менее протяженные фрагменты промотора, как одно-, так и двухцепочечные. С их помощью стала возможной экспериментальная проверка многих деталей НК-белковых взаимодействий на разных этапах транскрипции. Можно выделить два больших направления в этой области: изучение комплексообразования олигонуклеотидов с РНКП и получение ковалентно связанных комплексов олигонуклеотидов с ферментом. Использование для комплексообразования олигонуклеотидов неприродной структуры позволяет выявить влияние на процесс транскрипции изменений в первичной структуре ДНК и введения маркерных групп. Зачастую новые физико-химические методы невозможно использовать без применения синтетических модифицированных олигонуклеотидов. Второе направление — ковалентное связывание олигонуклеотидов с РНКП — активно развивается, так как является уникальным методом, позволяющим выявлять точечные контакты в структуре транскрипционного комплекса, максимально приближенного к его нативному состоянию.

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С
РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
СТАДИИ УЗНАВАНИЯ

Изучение комплексов олигонуклеотидов различной длины и структуры, являющихся фрагментами матричной и нематричной цепей промотора, а также двухцепочечных фрагментов промотора позволило к настоящему времени получить большое количество данных, касающихся функциональных особенностей взаимодействия фермента с промотором. Кроме того, удалось установить некоторые особенности структуры инициаторного комплекса.

Одной из классических в области изучения комплексов РНКП с синтетическими олигонуклеотидами — аналогами промотора, можно назвать работу Савинковой и соавт. [8]. Ими было показано, что РНКП обладает свойством специфично связываться с определенной консенсусной последовательностью — ТАТААТ (боксом Прибнова) — в области —10 бактериальных промоторов. Также было установлено, что с РНК-полимеразой связываются фрагменты нематричной цепи промотора либо двухцепочечные его участки, в то время как олигодезоксирибонуклеотиды из матричной цепи очень слабо взаимодействуют с ферментом. Выявлено, что олигорибонуклеотиды не конкурируют с олигодезоксирибонуклеотидами за связывание с ферментом. Это позволило предположить, что за связывание рибо- и олигодезоксирибонуклеотидов отвечают разные участки фермента. Показано, что избирательно связываемые РНКП одноцепочечные олигонуклеотиды обладают способностью к частичному ингибированию ДНК-зависимого синтеза РНК, тогда как двухцепочечные — не обладают подобным свойством. По всей видимости, одноцепочечные олигонуклеотиды блокируют сайт связывания РНКП с промотором либо сайт инициации транскрипции за счет комплементарных взаимодействий. [8]. В дальнейшем изучение взаимодействия РНКП с олигонуклеотидами из матричной и нематричной цепей промотора подтвердило ранее полученные данные. При этом было показано, что двухцепочечные фрагменты области —10 промоторов *spc* и *lacUV5* обладают еще большим сродством к промотору, нежели одноцепочечные олигонуклеотиды из нематричной цепи, включающие в себя бокс Прибнова и последовательность до сайта начала транскрипции и далее. Эффективность связывания одноцепочечных олигонуклеотидов нематричной цепи и двухцепочечных олигонуклеотидов из —10 области промотора составляла 35–36 % и 39–46 % соответственно, в то время как для одноцепочечных олигонуклеотидов матричной цепи эффективность связывания не превышала 5% [9].

Важным этапом изучения взаимодействия РНКП с синтетическими фрагментами области -10 промотора явилось исследование влияния последовательности, фланкирующей эту область со стороны стартовой точки транскрипции [8]. Показано, что наибольшее сродство фермент проявляет к олигонуклеотидам, имеющим в качестве фланкирующих С/G- либо G-участки. Сродство РНКП к А- или Т-участкам при этом ниже в 4–6 раз. Также было установлено, что сродство фермента к олигонуклеотиду определяется консенсусным участком области -10 промотора. Замена бокса Прибнова ТАТААТ на комплементарную ему последовательность 3'-АТАГТА-5' снижала сродство к РНКП на два порядка [8].

Стоит отметить, что позже в аналогичном исследовании [59] результаты оказались несколько иными. Принципиальным их отличием от работы [8] стали данные, говорящие в пользу того, что двухцепочечные олигонуклеотиды из области -10 промотора не связываются с белком наряду с одноцепочечными фрагментами матричной цепи. Позднее было получено подтверждение специфичности связывания фермента с -10 -областью промотора, а также определены количественные характеристики образования комплексов РНКП с одноцепочечными фрагментами нематричной цепи области -10 промотора. При этом константы диссоциации комплекса холо-РНКП и олигонуклеотидов нематричной цепи из области -10 промотора составляли ~ 7 нМ. Было показано, что замена в аминокислотной последовательности σ^{70} Q437H супрессирует замену Т \rightarrow С в положении -12 промотора [44].

В ряде работ изучалось взаимодействие РНКП с промотором на модели довольно длинных (до 200 пар нуклеотидов) синтетических олигонуклеотидов, не являющихся фрагментами промотора, но содержащих последовательности, которые специфично узнаются холо-ферментом (-10 -область), и некие соединяющие их спейсерные последовательности. Такие олигонуклеотиды получали конденсацией более коротких фрагментов с помощью полинуклеотидкиназы [4] или Т4 ДНК-полимеразы [26], поскольку современные методы синтеза олигонуклеотидов позволяют получать с достаточной степенью эффективности и чистоты олигонуклеотиды длиной до 90–100 нуклеотидных остатков. Использование подобных модельных соединений позволило установить, что 100–200-звенные двухцепочечные олигонуклеотиды, содержащие повторяющиеся фрагменты промоторов, образуют довольно устойчивые комплексы с РНКП. Так, олигонуклеотид, состоящий из повторяющейся последовательности Прибнова, образует с ферментом устойчивые к гепарину комплексы, стабильность которых соизмерима со стабильностью комплексов РНК-полимеразы с природным промотором *lacUV5*. В то же время комплексы

фермента с полинуклеотидом, содержащим повторяющуюся последовательность, гомологичную промотор-операторному району *trp*-оперона, характеризуются меньшей устойчивостью по сравнению с поли-ТАТААТ-последовательностью (период полураспада меньше приблизительно в 4 раза) [4]. Позже на модели 75-звенного фрагмента λP_R промотора, содержащего замены в определенных позициях области -35 и -10 , было исследовано значение для взаимодействия с РНКП некоторых нуклеотидных остатков. В частности, было показано, что 5-метильные группы двух соседних остатков тимидина в области -35 играют ключевую роль в узнавании промотора ферментом. Возможно также, что функциональные группы высококонсервативной пары Т·А в положении -7 принимают непосредственное участие в прямом взаимодействии с РНКП [27].

Среди подходов, основанных на изучении комплексообразования между РНКП и олигонуклеотидами, отдельно следует рассмотреть подход, базирующийся на использовании олигорибонуклеотидов. Одним из первых исследований связывания РНКП с олигорибонуклеотидами из статистических изоплитных смесей стала работа [2], в которой было показано, что все олигорибонуклеотиды с числом звеньев более 5 можно выделить из изоплитных смесей, насыщая их РНКП и выделяя комплексы гель-фильтрацией. При этом часть пентарибонуклеотидов связывается лабильно, часть — прочно. В лабильно и прочно связываемых фракциях олигонуклеотиды представлены набором 3–4 изоплит, разделяемых хроматографически. Было также установлено, что блокирование SH-групп фермента парахлормеркурибензоатом, равно как и денатурация белка с помощью мочевины, предотвращают образование комплексов с пентарибонуклеотидами. Разрушаются комплексы и при тепловой денатурации. Важным результатом работы было установление того, что РНКП в отсутствие σ -субъединицы не теряет способности связывать олигорибонуклеотиды [2].

Продолжением данной работы явилось исследование взаимодействия олигорибонуклеотидов с РНКП, проведенное Савинковой и соавт. [6]. Ранее, как уже упоминалось, было показано, что олигодезоксирибонуклеотиды связываются с РНКП и способны конкурентно ингибировать ДНК-зависимый синтез РНК. В работе было установлено, что олигорибонуклеотиды, гомологичные таким олигодезоксирибонуклеотидам из области -10 промотора *src*, связывающимся с РНКП, не способны взаимодействовать с ферментом. Однако олигорибонуклеотиды, комплементарные упомянутым олигодезоксирибонуклеотидам, этой способностью обладают. Они также конкурентно тормозят транскрипцию бактериальной ДНК. На основании полу-

ченных данных было построено предположение, что описанные олигорибонуклеотиды могут гибридизоваться на участке нетранскрибируемой нити ДНК и выполнять функции отщепляющейся впоследствии затравки или регулятора транскрипции [6].

Сравнительно недавно было установлено, что олигорибонуклеотиды могут служить ингибиторами инициации транскрипции [48]. Авторы показали, что пентарибонуклеотиды способны гибридизоваться с промотором антипараллельно внутри транскрипционного пузыря. Необходимое условие при этом — комплементарность этих олигонуклеотидов области ДНК-матрицы с позиции -5 до +2 относительно сайта начала транскрипции. Механизм ингибирования инициации транскрипции через гибридизацию рибоолигонуклеотидов в открытом комплексе и антипараллельная ориентация этих олигонуклеотидов были подтверждены путем гидролиза ДНК с помощью комплекса 1,10-фенантролина с медью. Также было показано, что систематическая модификация сахаро-фосфатного остова олигорибонуклеотида фосфотиолятными группами приводит к увеличению сродства при связывании в открытом комплексе и в результате делает модифицированные подобным образом олигорибонуклеотиды еще более эффективными агентами, ингибирующими инициацию транскрипции.

В некоторых работах при изучении инициаторного комплекса РНКП-промотор олигонуклеотиды служили носителями флуоресцирующих групп. Эти группы могут быть расположены как на 5'- или 3'-конце олигонуклеотида [36], так и внутри последовательности. Например, вместо пуриновых гетероциклических оснований в последовательность могут быть введены остатки 2-аминопурина, флуоресцирующего при длинах волн в диапазоне от 315 до 350 нм [37]. В работе [58] двухцепочечный олигонуклеотид нес на себе флуорохромную группу 6-карбоксих-родамина или 6-карбоксихфлуоресцеина.

Исследование образования комплекса между РНКП и одноцепочечными олигонуклеотидами из нематричной цепи области -10 промотора по возгоранию флуоресценции позволило определить равновесную константу ассоциации комплексов РНКП с различными олигонуклеотидами. Определение констант ассоциации для олигонуклеотидов, несущих в своем составе различные замены, подтвердило сиквенс-специфичность связывания фермента с -10-областью промотора и позволило выявить замены, наиболее сильно влияющие на взаимодействие фермента с данным участком промотора. Было установлено, что при взаимодействии фермента с олигонуклеотидами константа скорости реакции образования комплекса более чем в 10 раз ниже, нежели при взаимодействии с сильными промоторами [28].

Наряду с традиционными методами изучения НК-белковых взаимодействий стоит упомянуть и математическое моделирование ингибирования инициации транскрипции на примере антигенных олигонуклеотидов, образующих с двухцепочечной ДНК триплексные структуры [23]. С помощью этой модели был предсказан сайт связывания, который будет наиболее эффективной мишенью для подобных олигонуклеотидов при ингибировании инициации транскрипции. Также были предсказаны наиболее подходящие для ингибирования концентрации этих олигонуклеотидов.

Можно констатировать, что изучение комплексообразования олигонуклеотидов, являющихся фрагментами бактериальных промоторов, с РНКП позволяет получить весьма важные данные, характеризующие особенности взаимодействия фермент-промотор в инициаторном комплексе, а также установить некоторые структурные особенности строения комплекса, образуемого промотором и РНКП на стадии инициации. Вне всякого сомнения, дальнейшее изучение подобных комплексов с привлечением современных физико-химических и биологических методов, таких, как флуоресцентная спектроскопия и электронная микроскопия, направленный мутагенез и другие, позволит более детально определить структурно-функциональные особенности взаимодействия РНКП с промотором. Надо также отметить, что экспериментальные подходы, связанные с использованием олигонуклеотидов в качестве моделей промотора, являются чрезвычайно удобными в связи с относительной простотой синтеза олигонуклеотидов и возможностью легко вносить изменения в заданные положения их первичной структуры.

КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДНК С РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ: ТИПЫ РЕАГЕНТОВ, РАДИУС ДЕЙСТВИЯ, СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Среди методов изучения структуры и функций РНКП в комплексе с промотором важное место занимают методы ковалентных сшивок. Реагенты для их получения можно подразделить на специфические (позволяющие вводить сшивку в строго определенное положение цепи ДНК или белка) и неспецифические (с помощью которых реализуется образование ковалентной связи с любой группировкой белка или НК). В настоящем разделе будут рассмотрены реагенты обоих типов.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ КОВАЛЕНТНЫХ СШИВОК

Данную группу методов можно подразделить на методы с применением химических агентов и методы с использованием фотоактивации ДНК или белка в комплексе.

Рассмотрим вначале методы, связанные с фотоактивацией ДНК.

Одним из самых распространенных и хорошо разработанных к настоящему моменту является метод получения ковалентных сшивок с помощью УФ-облучения нуклеиново-белкового комплекса. Облучение обычно проводят светом с длиной волны 250–300 нм. При использовании данного метода возможно образование ДНК-ДНК и ДНК-белковых сшивок [17]. Подобный подход позволяет фиксировать тесные контакты между РНКП и промотором.

Первые эксперименты проводились *in vivo* облучением клеточной культуры ультрафиолетовым излучением, при этом были идентифицированы σ - и β -субъединицы [61]. Однако из результатов этих экспериментов нельзя было сделать определенных выводов о взаимодействии РНКП с промотором.

Подобным методом, но уже в системе *in vitro*, были определены и изучены контакты между промотором и отдельными субъединицами РНКП в неспецифическом и специфическом комплексах [55], а также в двойном и тройном комплексах [36]. Позже было проведено изучение контактов РНК-полимеразы с ДНК на всем протяжении промотора [18]. Изучение этим методом субкомплекса $\beta'\sigma$ с нематричной цепью промотора показало, что подобная совокупность двух субъединиц РНК-полимеразы может эффективно связываться с участками нематричной цепи промотора в отсутствие остальных субъединиц. Картирование сшивок в комплексе между кор-РНК-полимеразой и нематричной цепью промотора позволило установить участки белка, контактирующие с цепью ДНК. Оказалось, что они расположены между остатками Met 29 и Cys 58 в β' -субъединице и между Met 1230 и Met 1273 в β -субъединице. При добавлении σ -субъединицы образования таких сшивок не происходит. Это подтверждает то, что σ -субъединица вызывает некие конформационные изменения в кор-ферменте при взаимодействии с ним [39].

С помощью УФ-сшивок была установлена роль 6S РНК в регуляции транскрипции. Так, было показано, что устойчивая ассоциация σ -субъединицы и кор-РНКП возможна в присутствии 6S РНК и что она подавляет экспрессию с σ^{70} -зависимого промотора [72].

Переходя к применению химических реагентов для получения неспецифических ковалентных сшивок, в первую очередь необходимо отметить такой реагент, как формальдегид. Безусловно, существует достаточно большой набор бифункциональных реагентов, позволяющих осуществлять ДНК-белковые и белок-белковые сшивки — тетранитрометан, имидоэфиры, бисульфит натрия, карбодиимиды [41], однако формальдегид является самым распространенным среди прочих для получения ковалентных сшивок. Формальдегид, по-види-

тому, взаимодействует в ДНК с аминогруппами аденина, гуанина и цитозина, а также в меньшей степени — с иминогруппами тимина [30, 46]. Со стороны белка в реакции с формальдегидом могут участвовать α -аминогруппа и ϵ -аминогруппа лизина. Первые эксперименты по изучению комплекса промотора с РНКП с помощью формальдегидных сшивок проводились *in vivo*. При этом были идентифицированы ковалентно связанные комплексы β - и α -субъединиц с промотором [61]. Тем не менее, на основании полученных данных нельзя было судить о специфичности сшивки.

Позже была разработана система получения сшивок с помощью формальдегида *in vitro* [1, 16]. Поскольку сшивка происходит при достаточно высоких температурах, это свидетельствует в пользу определенной специфичности сшивки — реакция происходит по большей части с иминогруппами тиминов. Совсем недавно используя формальдегид в качестве сшивающего агента, удалось установить область локализации контактов между β' -субъединицей фермента и *lacUV5* промотором [16]. Оказалось, что сшивка промотора происходит с N-концевым участком β' , расположенным между остатками Cys 198 и Met 237, относящимся к эволюционно консервативному району В.

В работе [15] с помощью формальдегидных сшивок был подтвержден двухступенчатый механизм плавления промотора и показано, что плавление промотора и конформационные изменения в РНКП происходят одновременно. Необходимо заметить, что модификация предложенного в работе метода получения формальдегидных сшивок позволяет проводить реакцию при 14 °С. С использованием подобных сшивок «нулевой длины» была проанализирована структура открытого комплекса РНКП-промотор. Были получены подтверждения контактов РНКП с областями промотора, фланкирующими сайт начала транскрипции. Как и в работе [15], было показано, что структурные перестройки при взаимодействии σ -субъединицы с РНКП и с промотором происходят одновременно [66].

При использовании в качестве сшивающего реагента формальдегида может происходить образование белок-белковых сшивок: ϵ -аминогруппа лизина, реагируя с формальдегидом, переходит в аминоксидроксиметильную группу, которая, в свою очередь, может реагировать с остатками глутаминовой кислоты, тирозина и пр. Однако подобные сшивки внутри РНКП и между ее субъединицами разрушаются при небольшом нагревании, что позволяет установить состав только ковалентно связанных НК-белковых комплексов [52].

Значительная часть методов получения неспецифических ковалентных сшивок между ДНК и РНКП связана с модификацией промоторного участка ДНК на всем его протяжении.

Одним из таких способов является тотальная депуринизация ДНК [11, 22]. При этом промоторную ДНК обрабатывают диметилсульфатом в условиях, приводящих к удалению пуриновых оснований. В результате появляется реакционноспособная альдегидная группа в дезоксирибозном остатке. Она может реагировать с остатками гистидина, либо ϵ -аминогруппой лизина. Последующее расщепление молекулы ДНК в точке модификации приводит к тому, что белок остается связанным с 3'-концом одного из фрагментов ДНК через дезоксирибозу. Данным методом были установлены контакты β - и β' -субъединицы в составе холо-РНКП с областью «-45 — +25» в ДНК и контакты σ -субъединицы с участком «-35» в ДНК [11].

Недостатком всех перечисленных методов является невозможность введения активной группы, а следовательно, и сшивки в определенную позицию ДНК или белка. Однако в последнее время стали появляться работы, посвященные изучению контактов между РНКП и промотором в строго заданных позициях цепи ДНК. О них пойдет речь ниже.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОВАЛЕНТНЫХ СШИВОК

Под специфическими ковалентными сшивками мы подразумеваем методы, позволяющие осуществлять ковалентное связывание с белком по определенным группировкам в структуре ДНК или белка. Очевидно, что возможно пересечение части методов, касающихся получения и неспецифических, и специфических ковалентных сшивок. Так, методом облучения УФ возможно получение как неспецифических, так и специфических сшивок.

Довольно широко распространенным подходом к получению ковалентных сшивок является введение в определенную позицию ДНК фотоактивируемых реакционноспособных групп. Это могут быть остатки 4-тиотимидина [31], 5-бром- или 5-иод-урацила [65], а также другие фотоактивируемые синтетические группировки, которые могут быть введены практически в любую позицию олигонуклеотида.

Вначале получают комплекс фермента с фотоактивируемым агентом. Полученный комплекс подвергают облучению ультрафиолетом. При этом может образоваться ковалентная связь ДНК с белком, причем аминокислотный остаток должен находиться на расстоянии не более 4 нм от цепи ДНК. Подобный подход позволяет тестировать тесные контакты между РНКП и гетероциклическим основанием промотора. Среди преимуществ метода следует отметить быстроту реакции, а также возможность облучения светом с длиной волны более 300 нм, что позволяет избежать фотоповреждений ДНК и белка.

Относительно недавно появились работы, в которых в качестве активного реагента использовали модифицированные по уникаль-

ному сайту олигонуклеотиды. Одни из них, например, содержащие 5-иоддезоксигуанидин, синтезировали химическим путем [53], а другие, содержащие 4-(N-(p-азидобензоил)-2-аминоэтил)-дезокситидин, — энзиматически [42] путем присоединения модифицированного дезоксирибонуклеозидтрифосфата к 3'-концу олигонуклеотида посредством ДНК-полимеразы.

В настоящее время авторами данного обзора разработан метод получения ковалентно связанных белково-нуклеиновых комплексов с помощью олигонуклеотидов, активированных по 5'-концевой или межнуклеотидной фосфатной группе [5]. В последнее время подобные реагенты стали применяться и для изучения взаимодействия РНКП с ДНК.

Суть метода заключается в следующем. Фосфат, расположенный на 5'-конце олигонуклеотида, модифицируется введением N-оксибензотриазоловой группы. Такой олигонуклеотид способен реагировать либо с ϵ -аминогруппой лизина, либо с остатком гистидина в белке. Применение этого подхода позволяет определить субъединицу белка, с которой произошла сшивка, и установить природу аминокислоты, с которой прореагировал активированный олигонуклеотид. Последующее применение методов ограниченного химического расщепления ковалентно связанного комплекса позволяет выявить район субъединицы, с которым взаимодействует данный олигонуклеотид. При этом иногда удается идентифицировать аминокислотный остаток, прореагировавший с активной фосфатной группой олигонуклеотида. Применение данного подхода позволило установить, что в комплексе с холо-РНКП все олигонуклеотиды из нематричной цепи промотора образуют ковалентно связанные комплексы с субъединицей σ^{70} . Анализ продуктов частичного расщепления ковалентно связанных комплексов по остаткам Met или Cys в SDS-ПААГ показал, что фосфат в положении -12 контактирует с остатком His 180 или His 242 σ^{70} , расположенным между первым и вторым консервативными районами. Фосфат в положении -15 оказался сближен с остатками Lys из двух разных районов — между Met 413 и Met 456 (районы 2.3 и 2.4) и между Met 470 и Met 507 (район 3.1); фосфат в положении -18 контактирует предпочтительно с остатком Lys, расположенным между остатками Met 470 и 507 (район 3.1). На основании полученных данных была предложена модель расположения олигонуклеотида относительно σ^{70} в составе холо-фермента, основываясь на ранее описанной структуре изолированной σ^{70} [5].

В настоящее время нами проводятся эксперименты по использованию в качестве моделей промотора олигонуклеотидов, в которых одна из межнуклеотидных фосфатных групп химическим путем заменена на тризамещенную пиррофосфатную группу. Такие соединения,

так же, как и описанные выше активные эфиры олигонуклеотидов, обладают свойством фосфорилировать остатки лизина или гистидина белка, сближенные в структуре специфического комплекса.

Таким образом, применение обоих типов указанных селективных реагентов позволяет тестировать контакты РНКП со строго определенными позициями фосфатных групп в цепи ДНК, базируясь на применении олигонуклеотидов как моделей промотора.

Безусловно, широкое использование методов получения ковалентно связанных комплексов РНКП с олигонуклеотидами-фрагментами промотора и собственно с промотором открывает новые возможности для изучения структуры и функций РНКП в составе комплекса с промотором.

VII. ХИМИЧЕСКИЙ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КОМПЛЕКСОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ С ПРОМОТОРОМ

Среди методов изучения структурно-функциональной организации комплексов РНК-полимеразы с ДНК-промотором следует выделить метод химического или ферментативного расщепления белка или ДНК в комплексе.

Ниже будут рассмотрены основные принципы реализации данного подхода и полученные результаты. Расщепляющий агент может быть введен в определенное положение белка или ДНК еще до образования комплекса. Обычно этот прием используется при тестировании контактов. Для восстановления участка белка или расплетенного фрагмента ДНК, вовлеченных в комплексообразование, расщепляющий агент (перманганат-ион, гидроксильные радикалы, протеиназы, эндо- и экзонуклеазы) добавляют к уже сформированному комплексу. Различные расщепляющие агенты позволяют тестировать специфические особенности структуры: например, участки ДНК, закрытые белком в структуре комплекса и недоступные действию агента (эндо- и экзонуклеазы, гидроксильные радикалы [16]; участки НК, сближенные в структуре комплекса с определенными участками белка или расплетенные участки двухцепочечной ДНК [40].

Вне зависимости от расщепляющего агента и способа его введения, картина расщепления характеризует особенности пространственной структуры комплекса.

Вначале рассмотрим подход, связанный с расщеплением ДНК.

МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ ДНК

Зачастую для расщепления НК используется обработка реагентами химической или ферментативной природы, которые в подобран-

ных условиях расщепляют НК в ряде положений. Это приводит к образованию набора фрагментов НК, различающихся по длине, которые при разделении в ПААГ образуют набор полос — «футпринт». Затем сравнивают набор полос, образуемый при расщеплении свободной НК и НК в комплексе с белком, и по различию узоров делают выводы о структуре комплекса. Такой метод носит название футпринтинга.

В работе [16] ковалентно связанный открытый комплекс обрабатывали Fe-ЭДТА, аскорбатом и пероксидом водорода. При такой обработке генерируются гидроксильные радикалы, расщепляющие ДНК в незащищенных белком областях. Таким образом были определены участки взаимодействия промотора *lac UV5* с β и β' -субъединицами РНКП. Ковалентно связанная β' защищает ДНК в области от -5 до +2 (максимум -3 и +2); ковалентно связанная β защищает ДНК в области от -6 до +2 (максимум -5 и -3).

Расщепление ионами перманганата при обработке НК-белкового комплекса перманганатом калия позволяет тестировать расплетенные участки ДНК, поскольку при такой обработке модифицируются не вовлеченные в комплементарные взаимодействия пиримидиновые остатки, что делает ДНК в точках модификации подверженной действию гидролизующего агента. [16, 40]. Электрофоретическое разделение продуктов гидролиза позволяет определить положения модифицированных остатков и установить положение одноцепочечной ДНК. В комплексе РНКП с промотором это дает возможность определить положение расплетенного участка ДНК (транскрипционного пузыря). Следует отметить, что модификации оснований не препятствует присутствие белка в данном участке НК, причем модификация перманганатом происходит быстро — в течение нескольких секунд.

С помощью перманганатного футпринтинга [1] было показано, что ковалентное связывание, индуцируемое формальдегидной обработкой комплекса РНКП с промотором, протекает только в расплетенной области ДНК.

Один из вариантов этого подхода связан с введением химических расщепляющих агентов (т.н. «химических нуклеаз») в комплекс РНК-полимераза — промотор. Одной из хорошо разработанных и эффективных методик химического расщепления как белка, так и ДНК к настоящему моменту стало введение реакционноспособных групп в строго определенные положения аминокислотной последовательности белка. В частности, весьма интересные результаты были получены при введении в состав белка (S)-1-(p-бромацетамидобензил)-этилендиаминтетраацетата железа (в английской аббревиатуре FeBABE) [55]. Данный реагент селективно вводится по остаткам цистеина, не теряя при этом гидролизующей способности. Для изучения районов ДНК,

контактирующих с участками белка, содержащими остаток FeBAVE, была получена серия мутантов σ^{70} -субъединицы белка, из которых были удалены природные остатки цистеина и в одно заданное место (132, 376, 396, 422, 496, 517, 581) вводился остаток Cys. С остатком цистеина специфически взаимодействовал упомянутый выше расщепляющий реагент. В результате модифицированная σ^{70} являлась носителем гидролизующего агента. При взаимодействии либо с кор-ферментом, либо с промотором происходило расщепление белковой или нуклеотидной цепи в месте, сближенном с остатком цистеина, несущего FeBAVE. Для корректной интерпретации результатов было показано, что у полученных мутантных σ^{70} способность выполнять присущие им транскрипционные функции незначительно снижена (за исключением мутанта 422С). Было установлено, что обе цепи ДНК доступны для расщепляющего агента, находящегося в консервативных областях 1.2, 2.1, 2.3, 3.1, 3.2 и 4.2 σ^{70} -субъединицы. Также установлены предпочтительные контакты консервативных районов РНК-полимеразы с определенными участками промотора. В частности показано, что консервативный район 2.1, по сложившимся представлениям контактировавший с кор-ферментом, участвует во взаимодействии с участком промотора от положения -10 до $+12$. Район 3.2 расположен вблизи участка расплетенной цепи промотора в области $+1$, предпочтительно взаимодействуя с матричной цепью ДНК. Консервативная область 3.1 взаимодействует с участком промотора между районами -10 и -35 в равной степени с матричной и нематричной цепями. Консервативный район 4.2 сближен с участком -35 ДНК-промотора, что полностью согласуется с ранее полученными результатами. В целом полученные данные позволили сделать вывод о том, что консервативный район 2 расположен вблизи -10 -области промотора, консервативный район 3 сближен с областью $+1$ ДНК, а район 4 расположен вблизи -35 -области промотора. В итоге на основании результатов химического расщепления комплекса РНК-полимераза-промотор и данных рентгеноструктурного анализа фрагмента σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы была предложена модель взаимного расположения цепи промотора и α -спирали белка. Согласно этой модели цепи расположены параллельно и направления 5'-конца олигонуклеотида и N-конца белка совпадают [55]. Необходимо заметить, что эта модель имеет ряд принципиальных отличий от модели, предложенной ранее [34].

Позже этот подход получил дальнейшее развитие. Была предложена, а затем реализована идея создания библиотеки мутантов σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы, несущих гидролизующий агент в различных положениях аминокислотной последовательности [71].

При этом разрабатывался иной подход к введению FeBAVE в состав белка. «Химическая нуклеаза» вводилась на ϵ -аминогруппы лизина с использованием в качестве мостикового агента 2-иминотиолана. При этом было показано, что радиус действия активной группы в составе белка составляет 12 ± 4 Å, временами достигая 18 Å. Также была показана специфичность подобных мутантов σ^{70} по отношению к кор-ферменту. Установлено, что в процессе гидролиза выход продуктов расщепления комплекса составляет 10%, причем 9,5% являются продуктами одноударного расщепления. С помощью полученной библиотеки мутантных σ^{70} , содержащих гидролизующий агент, подтвердились предыдущие результаты по установлению контактов ДНК-промотора с РНК-полимеразой и данными футпринтинга с помощью этилендиаминтетраацетата железа (FeEDTA) [71].

Среди методов химического расщепления комплексов РНК-полимераза—промотор нужно остановиться на том, который был использован для определения контактов в активном центре РНКП. Суть метода заключается в том, что в качестве хелатообразующего агента вместо Mg^{2+} в структуре активного центра РНКП используется Fe^{2+} . Последующее добавление восстановителя — дитиотреитола или аскорбиновой кислоты — приводит к возникновению гидроксильных радикалов, которые расщепляют участки белка либо нуклеиновой кислоты, расположенные вблизи активного центра фермента, связывающего двухвалентные ионы металла. Использование подобного подхода позволило установить особенности модульной организации активного центра РНК-полимеразы, состоящего как минимум из шести различных доменов, относящихся к β - и β' -субъединицам белка [51]. Также было показано, что в промоторном комплексе гидроксильные радикалы расщепляют цепь ДНК в области сайта начала транскрипции, а белок подвергается расщеплению в участке, содержащем консервативный мотив NADFDGD. Таким образом, можно говорить о том, что данный консервативный участок аминокислотной последовательности РНК-полимеразы участвует в связывании иона Mg^{2+} [76].

Из методов расщепления ДНК необходимо отметить достаточно новый метод расщепления с помощью комплекса меди и 1,10-фенантролина [48]. Эта работа упоминалась в разделе, посвященном комплексообразованию олигонуклеотидов с РНКП, поэтому мы не будем на ней подробно останавливаться.

В заключение этого раздела следует отметить, что во всех случаях расщепления ДНК продукты гидролиза идентифицируют с помощью ^{32}P -мечения НК, а анализ первичной структуры образующихся фрагментов выполняют методом Максама-Гилберта.

МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКА

Для установления фрагмента белка или аминокислотного остатка, участвующего в образовании ковалентной связи с НК, применяется целый ряд подходов и методов. В случае РНКП по причине сложной организации этого фермента наиболее приемлемым оказался подход, заключающийся в ограниченном химическом или ферментативном расщеплении.

Метод ограниченного химического протеолиза заключается в обработке белка, ковалентно связанного с промотором или его участком, реагентами, избирательно расщепляющими белок по определенным аминокислотным остаткам в одноударных условиях, то есть в условиях, когда на одну молекулу белка приходится не более одной позиции расщепления. Так, для расщепления белка по остаткам метионина используется бромциан, по остаткам цистеина — 2-нитро-5-тиоцианбензойная кислота, по остаткам триптофана — BNPS-скатол [43]. Данный подход, как уже указывалось, используется как метод локализации контактов в ковалентном комплексе белка и промотора либо его фрагмента. С помощью данного подхода, в частности, был установлен контакт 3'-конца промотрной цепи ДНК с β' -субъединицей РНК-полимеразы в районе между Met⁹³² и Trp¹⁰²⁰, принадлежащем N-концу субъединицы и заключающем в себе консервативный фрагмент RTFHIGG [13]. Применение данного подхода позволило также установить, что кластер мутаций устойчивости к рифампицину I расположен в области связывания 5'-конца рибоолигонуклеотидов, образующихся в процессе abortивной инициации и элонгации транскрипции. Подобный результат позволил сделать определенные выводы о структурных особенностях рифампицин-устойчивых мутаций β' -субъединицы [63]. Следует отметить работы, связанные с установлением особенностей структурных взаимодействий внутри открытого комплекса РНК-полимеразы с промотором. В частности, был изучен ковалентно связанный комплекс $\beta'\sigma$ с промотором, полученный методом облучения ультрафиолетом. Показано, что подобный фрагмент эффективно связывается с нематричной цепью промотора. Это позволило сделать вывод о том, что при взаимодействии с β' -субъединицей в структуре σ -субъединицы происходят конформационные изменения, освобождающие ее сайт связывания одноцепочечной ДНК. При этом взаимодействие олигонуклеотида происходит с консервативным районом 2 в составе σ^{70} . С помощью картирования ковалентно связанных комплексов были определены участки в составе кор-РНКП, ответственные за неспецифическое связывание с промотором. Они оказались расположены между остатками Met 29 и Cys 58 β' -субъединицы и остатками Met 1230 и Met 1273 β -субъединицы [40].

Недавно были получены результаты исследования ковалентно связанного комплекса холо-РНКП с промотором, полученного путем обработки формальдегидом. Картирование подобного комплекса позволило предположить, что N-концевой участок β' -субъединицы, взаимодействующий с нематричной цепью промотора, может также взаимодействовать с σ -субъединицей в процессе образования открытого комплекса [16]. Совсем недавно на основании данных картирования ковалентных комплексов НОВТ-эфиров олигонуклеотидов с σ^{70} была предложена модель расположения олигонуклеотида из –10-области промотора относительно σ^{70} [5]. Эта модель коррелирует с моделью, предложенной ранее [43].

Одним из подходов к изучению структуры белка в составе белково-нуклеинового комплекса является использование энзиматического расщепления фермента в комплексе с промотором. Наиболее разработанным методом является расщепление трипсином. Комплекс подвергают обработке трипсином; продукты протеолиза разделяют в ПААГ в денатурирующих условиях. При этом удается устанавливать функционально значимые и незначимые участки аминокислотной последовательности. В частности, применение трипсинолиза позволило установить, что фрагмент β -субъединицы, расположенный между остатками 940–1040, содержит сайт расщепления трипсином. Отсюда был сделан вывод о его необязательности для нормального функционирования белка. Однако наряду с этим было установлено наличие сайта расщепления трипсином в консервативном цинк-связывающем домене (Arg^{81}) [14].

С помощью ограниченного химотрипсинолиза, а также расщепления рядом других протеаз — эластазой, папаином и т.д., были изучены свободная σ^{70} в растворе, ее комплекс с кор-ферментом и Mg^{2+} -зависимый открытый комплекс с λP_R промотором. Следует заметить, что при протеолизе комплекса σ^{70} с промотором расщепление по некоторым сайтам не происходит, по всей видимости, из-за недоступности этих сайтов для соответствующих протеаз. В результате были установлены сайты связывания σ^{70} с кор-ферментом в холо-РНКП и в открытом комплексе, а также участки взаимодействия σ^{70} с промотором. За взаимодействие с кор-ферментом отвечают участки 2.1 и 4.2 σ^{70} , при этом участок 4.2 взаимодействует с α -субъединицами фермента. В открытом комплексе с цепью ДНК оказываются сближены консервативные участки 1.2, 2.4 и 4.2, что согласуется с результатами, полученными другими исследователями. На основании полученных данных была предложена модель конформационных изменений, происходящих в белке при взаимодействии σ^{70} с кор-ферментом и при образовании открытого комплекса РНКП с промотором [47].

Для локализации модифицированных аминокислотных остатков в РНКП используется ограниченный трипсинолиз белка. Например, для изучения топографии остатков цистеина белок подвергали карбоксиметилированию иодуксусной кислотой; модифицированные субъединицы разделяли с помощью электрофореза на ацетатцеллюлозе. Количество модифицированных остатков цистеина устанавливали затем по числу радиоактивных пятен на пептидных картах триптических гидролизатов. Таким образом определялось количество экспонированных остатков цистеина; структура полученных пептидов определялась по Эдману. В итоге была предложена модель расположения остатков цистеина в α -субъединицах РНКП, суть которой заключается в том, что остатки Cys269 сближены в обеих α -субъединицах, поскольку при их окислении образуется дисульфидную связь, а карбоксиметилирование одного из остатков цистеина препятствует карбоксиметилированию второго. Сближены также остатки Cys176 и Cys269, поскольку ионы ртути образуют между ними внутримолекулярную сшивку [9].

Среди методов анализа РНКП следует отметить белковый футпринтинг с помощью гидроксильных радикалов. Данный метод широко используется, в частности, для изучения конформационных изменений белка в процессе образования открытого комплекса [36], а также других комплексов РНКП, образующихся на разных этапах транскрипции.

В предыдущем разделе, посвященном расщеплению ДНК, был упомянут гидролизующий агент FeВАВЕ, ныне широко использующийся для анализа НК-белковых и белок-белковых комплексов. Не останавливаясь подробно, упомянем некоторые работы, в которых с помощью данного реагента анализировали те или иные детали процесса транскрипции в *E. coli*.

С помощью этого реагента, введенного в состав анти- σ -фактора Rsd, был установлен сайт взаимодействия этого фактора с σ^{70} -субъединицей РНКП [37]. С помощью FeВАВЕ-футпринтинга было установлено, что инвариантная аминокислота Arg383 в составе σ^{54} -субъединицы не взаимодействует с ДНК, а по всей видимости играет определенную роль в связывании фактора с кор-РНКП и в поддержании стабильности σ^{54} в условиях *in vivo* [74]. Для этого провели замену Arg383 на Cys, а затем модифицировали данный остаток FeВАВЕ и провели расщепление ДНК в открытом комплексе. С помощью этого же реагента, введенного в состав σ^{54} -субъединицы, были установлены сайты β - и β' -субъединиц, сближенные между собой. Большинство из них, как выяснилось, ранее были идентифицированы как сближенные с σ^{70} и σ^{54} . Это говорит о том, что для взаимодействия с двумя различными классами σ -факторов используется один общий набор последовательностей [74]. С помощью FeВАВЕ были установ-

лены структурные особенности расположения одного из представителей семейства σ -факторов — σ^S — в составе открытого комплекса. Наиболее значительная степень гидролиза ДНК наблюдалась в случае введения FeBAVE в состав регионов от 2.2 до 3.1 σ^S -субъединицы. В противоположность σ^{70} , регион 2.1 σ^S , по-видимому, расположен достаточно далеко от ДНК. Регион 4.2 σ^S , судя по всему, менее доступен, чем аналогичный ему в составе σ^{70} , а FeBAVE, расположенная в месте поворота в мотиве «спираль-поворот-спираль», очень слабо реагирует с ДНК. На основании полученных данных авторы полагают, что роль –35-последовательности промотора в узнавании σ^S -субъединицы невелика [24].

В заключение можно отметить, что методы химического и ферментативного расщепления белка и ДНК в комплексе РНКП-промотор являются безусловно важными для изучения деталей структуры фермента и его функционирования. Данные методы являются как самоценными подходами для изучения структурно-функциональных особенностей белково-нуклеиновых комплексов, так и служат важным инструментом, дополняющим арсенал других методов, таких, как мутагенез, ковалентное связывание олигонуклеотидов с белком и т.д.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За несколько последних лет существенно расширились наши знания о транскрипции в клетках *E. coli*, о чем свидетельствует огромный поток приведенных в обзоре литературных данных. Очевидно, этому способствовало применение новых методов изучения взаимодействия белка с ДНК. Многие из них не являются революционными, однако их применение открывает перед исследователями широкие возможности для наблюдения за процессом транскрипции в реальном времени. Появились и принципиально новые физические методы, такие, как наблюдение за взаимодействием единичной молекулы ДНК с единичной молекулой РНКП с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения. Совокупность методов кросслинка, комплексообразования, анализа продуктов элонгации с вышеуказанными новыми физическими методами позволила выйти на новый уровень понимания процесса транскрипции. Знание деталей данного процесса дает нам в руки ключ к освоению механизмов регуляции транскрипции и, как следствие, позволяет осуществлять направленную регуляцию этого процесса. Учитывая, что механизмы транскрипции в прокариотах и эукариотах подобны, на основании сведений об этих механизмах становится возможным создание терапевтических средств, действующих с высокой избирательностью и обладающих минимальной токсичностью для человеческого организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бродолин К.Л., Студитский В.М., Мирзабеков А.Д. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. С. 1085–1092.
2. Ефимова Л.Ю., Кнорре В.Л., Василенко С.К., Савинкова Л.К., Салганик Р.И. // 1976. Молекуляр. биология. Т. 10(2). С. 378–385.
3. Камзолова С.Г., Иванова Н.Н., Камзалов С.С., Якушевич Л.В. // Биофизика. 1998. Т. 43(3). С. 433–437.
4. Королева О.Н., Шабарова З.А., Бибилашвили Р.Ш. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19(2). С. 516–523
5. Рудакова Е.А., Ивановская М.Г., Козлов М.В., Хоретоненко М.В., Орецкая Т.С., Никифоров В.Г. // 2000. Биохимия. Т. 65(6). С. 640–650.
6. Савинкова Л.К., Соколенко А.А., Кель А.Э., Тулохонов И.И., Кнорре В.Л., Салганик Р.И., Веньяминова А.Г., Репкова М.Н., Комарова Н.И. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27(1). С. 64–73.
7. Савинкова Л.К., Соколенко А.А., Кель А.Э., Тулохонов И.И., Кумарев В.П., Баранова Л.В., Пар В.А., Салганик Р.И. // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30(1). С. 188–191.
8. Савинкова Л.К., Кнорре В.Л., Салганик Р.И. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18(3). С. 637–646.
9. Савинкова Л.К., Баранова Л.В., Кнорре В.Л., Салганик Р.И. // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22(3). С. 807–812.
10. Селюченко О.А., Чертов О.Ю., Липкин В.М. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11(4). С. 480–491.
11. Ченчик А.А., Бибилашвили Р.Ш., Мирзабеков А.Д. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 260(3). С. 765–768.
12. Bar-Nahum G., Nudler E. // Cell. 2001. Vol. 106. 443–451
13. Borukhov S., Lee J., Goldfarb A. // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 23932–23935.
14. Borukhov S., Severinov K., Kashlev M., Lebedev A., Bass I., Rowland G.C., Lim P.-P., Glass R., Nikiforov V., Goldfarb A. // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 23921–23926.
15. Brodolin K, Buckle M. // 2001. J. Mol. Biol. Vol. 307(1). P. 25–30
16. Brodolin K., Mustaev A., Severinov K., Nikiforov V. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275(5). P. 3661 – 3666.
17. Bucle M., Buc H. // 1994. In: Transcription: mechanisms and regulation, edited by R.C. Conaway and J.W. Conaway, Raven Press Ltd., N.-Y.
18. Bucle M., Geiselman J., Kolb A., Buc H. // Nucl. Acids Res. 1994. Vol. 19. P. 833–840.
19. Burgess RR, Anthony L. // Curr. Opin. Microbiol. 2001. Vol. 4(2). P. 126–131.
20. Busby S., Ebright R.H. // Cell. 1994. Vol. 79. P. 743–746.
21. Callaci S., Heyduk T. // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 3312–3320.
22. Chenchic A.R., Beabealashvili R., Mirzabekov A. // FEBS Lett. 1981. Vol. 128. P. 46–50.
23. Cheng B, Fournier RL, Relue PA. // Biotechnol. Bioeng. 2000. Vol. 70(4). P. 467–472.
24. Colland F., Fujita N., Kotlarz D., Bown J.A., Meares C.F., Ishihama A., Kolb A. // EMBO J. 1999. Vol. 18(14). P. 4049–4059.
25. Darst S.A., Kubalek E.W., Kornberg R.D. // Nature. 1989. Vol. 340. P. 730–732.
26. deHaseth P.L., Helmann J.D. // Mol. Microbiol. 1995. Vol. 16. P. 817–824.
27. Dubendorff J.W., deHaseth P.L., Rosendahl M.S., Caruthers M.H. // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262(2). P. 892–898.
28. Fedoriw A.M., Liu H., Anderson V.E., deHaseth P.L. // Biochemistry. 1998. Vol. 37. P. 11971–11979.
29. Finn R.D., Orlova E.V., Gowen B., Buck M., van Heel M. // EMBO J. 2000. Vol. 19(24). P. 6833–6844.
30. Frank-Kamenetskii M.D. // 1985. In: Structure and motion: membranes,

- nucleic acids and proteins. Edited by E. Clementy, G. Gorongiu, M.H. Sarma, R.H. Sarma, Adenine Press.
31. Frischauf A.M., Scheit K.H. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1973. Vol. 53. P. 1227–1233.
 32. Guthold M, Zhu X, Rivetti C, Yang G, Thomson NH, Kasas S, Hansma HG, Smith B, Hansma PK, Bustamante C. // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77(4). P. 2284–2294.
 33. Harada Y., Funatsu T., Murakami K., Nonoyama Y., Ishihama A., Yanagida T. // *Biophys. J.* 1999. Vol. 76. P. 709–715.
 34. Heyduk E., Heyduk T. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274(6). P. 3315–3322.
 35. Heyduk E, Baichoo N, Heyduk T. // *J. Biol. Chem.* 2001. Sep. 24.
 36. Hillel Z., Wu C.-W. // *Biochemistry.* 1978. Vol. 17. P. 2954–2960.
 37. Jishage M, Dasgupta D, Ishihama A. // *J. Bacteriol.* 2001. Vol. 183(9). P. 2952–2956.
 38. Komissarova N., Kashlev M. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 15329–15338.
 39. Kulbachinskiy A., Mustaev A., Goldfarb A., Nikiforov V. // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 454. P. 71–74.
 40. Kumar A., Malloch R.A., Fujita N., Smillie D.A., Ishihama A., Hayward R.S. // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 232. P. 406–418.
 41. Kunkel G.R., Mehrabian M., Martinson H.G. // *Molecular and cellular biochemistry.* 1981. Vol. 34. P. 3–13.
 42. Lanutti B.J., Persinger J., Bartholomew B. // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35. P. 9821–9831.
 43. Markovtsov V., Mustaev A., Goldfarb A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 3221–3226.
 44. Marr M.T., Roberts J.W. // *Science.* 1997. Vol. 276. P. 1258–1260.
 45. McClure W.R. // *Ann. Rev. Biochem.* 1985. Vol. 54. P. 171–204.
 46. McGhee J.D., von Hippel P.H. // *Biochemistry.* 1975. Vol. 14 P. 1281–1303.
 47. McMahan S.A., Burgess R.R. // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 12424–12431.
 48. Milne L., Perrin D.M., Sigman D.S. // *Methods.* 2001. Vol. 23(2). P. 160–168
 49. Moyle H., Waldburger C., Susskind M.M. // *J. Bacteriol.* 1991. Vol. 173. P. 1944–1950.
 50. Mukhopadhyay J., Kapanidis A.N., Mekler V., Kortkhonjia E., Ebright Y.W., Ebright R.H. // *Cell.* 2001. Vol. 106. P. 453–463
 51. Mustaev A., Kozlov M., Markovtsov V., Zaychikov E., Denissova L., Goldfarb A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 6641–6645.
 52. Naryshkin N., Revyakin A., Kim Y., Mekler V., Ebright E.H. // *Cell.* 2000. Vol. 101. P. 601–611.
 53. Nudler E., Goldfarb A. // *Science.* 1996. Vol. 273. P. 211–217.
 54. Otomo T., Yamazaki T., Murakami K., Ishihama A., Kyogoku Y. // *J. Biochem. (Tokyo).* 2000. Vol. 128(2). P. 337–344.
 55. Owens J.T., Chmura A.J., Murakami K., Fujita N., Ishihama A., Meares C.F. // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 7670–7675.
 56. Park C.S., Hillel Z., Wu C.-W. // *Nucl. Acids Res.* 1980. Vol. 8. P. 5895–5912.
 57. Rippe K. // *Biochemistry.* 2000. Vol. 39(9). P. 2131–2139.
 58. Rivetti C., Guthold M., Bustamante C. // *EMBO J.* 1999. Vol. 18(16). P. 4464–4475.
 59. Roberts C.W., Roberts J.W. // *Cell.* 1996. Vol. 86. P. 495–501.
 60. Ross W., Gosink K.K., Salomon L., Igarashi K., Zhou C., Ishihama A., Severinov K., Gourse R.L. // *Science.* 1993. Vol. 262. P. 1407–1413.
 61. Schouten J.P. // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 9929–9935.
 62. Severinov K. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2000. Vol. 3(2). P. 118–25.
 63. Severinov K., Mustaev A., Severinova E., Kozlov M., Darst S.A., Goldfarb A. // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270(49). P. 29428–29432.

64. Severinova E., Severinov K., Fenyo D., Marr M., Roberts J.W., Chait B.T., Darst S.A. // *J. Mol. Biol.* 1996. Vol. 263. P. 637–647.
65. Simpson R.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. Vol. 76. P. 3233–3237.
66. Singer P., Wu C.-W. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 14178–14189.
67. Studitsky V., Brodolin K., Liu Y., Mirzabekov A. // *Nucl. Acids Res.* 2001. Vol. 29(3). P. 854–861.
68. Sujatha S., Chatterji D. // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 454(1–2). P. 169–71.
69. Svergun D.I., Malfois M., Koch M.H., Wigneshweraraj S.R., Buck M. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275(6). P. 4210–4214.
70. Thomson N.H., Smith B.L., Almqvist N., Schmitt L., Kashlev M., Kool E.T., Hansma P.K. // *Biophys. J.* 1999. Vol. 76(2). P. 1024–33.
71. Traviglia S.L., Datwyler S.A., Meares C.F. // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. P. 4259–4265.
72. Wassarman K.M, Storz G. // *Cell.* 2000. Vol. 101(6). P. 613–623.
73. Wigneshweraraj S.R., Fujita N., Ishihama A., Buck M. // *EMBO J.* 2000. Vol. 19(12). P. 3038–3048.
74. Wigneshweraraj S.R., Ishihama A., Buck M. // *Nucl. Acids Res.* 2001. Vol. 29(5). P. 1163–1174.
75. Yasuno K., Yamazaki T., Tanaka Y., Kodama T.S., Matsugami A., Katahira M., Ishihama A., Kyogoku Y. // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 306(2). P. 213–225.
76. Zaychikov E., Martin E., Denissova L., Kozlov M., Markovtsov V., Kashlev M., Heumann H., Nikiforov V., Goldfarb A., Mustaev A. // *Science.* 1996. Vol. 273. P. 107–109.
77. Zhang G., Campbell E., Minakhin L., Richter C., Severinov K., Darst S.A. // *Cell.* 1999. Vol. 98. P. 811–824.