

Химические подходы к изучению матричного биосинтеза: общие вопросы и исследование транскрипции

Д.Г.Кнорре, Н.В.Кудряшова, О.И.Лаврик

Новосибирский институт биоорганической химии

Сибирского отделения Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8, факс (383–2)35–1665

Рассмотрены химические подходы к изучению систем матричного биосинтеза. Описаны общие решаемые с помощью этих подходов проблемы матричного биосинтеза и основные результаты, полученные применительно к транскрипции. Особое внимание уделено результатам, полученным при исследовании взаимодействия РНК-полимеразы и ее субъединиц с ДНК и РНК-продуктом. Описаны подходы к изучению активного центра РНК-полимераз методом аффинной модификации, а также взаимодействие эукариотических факторов транскрипции с ДНК.

Библиография — 64 ссылки.

Оглавление

I. Введение	401
II. Некоторые общие проблемы матричного биосинтеза нуклеиновых кислот	402
III. Специфические химические подходы, используемые при изучении полимераз нуклеиновых кислот	404
IV. Основные стадии транскрипции. Субъединичная структура РНК-полимераз	406
V. Взаимодействие РНК-полимеразы и ее субъединиц с ДНК	406
VI. Исследование участка ДНК, расплетенного в комплексе с РНК-полимеразой (вздутия)	408
VII. Исследование коридора выхода РНК	408
VIII. Подходы к изучению активного центра РНК-полимераз методом аффинной модификации	410
IX. Исследование взаимодействия эукариотических факторов транскрипции с ДНК	411
X. Заключение	412

I. Введение

Огромная роль химических методов в изучении белков, нуклеиновых кислот и их комплексов, выполняющих тончайшие функции в живых организмах, в том числе в системах матричного биосинтеза, общеизвестна и бесспорна. Химические методы лежат в основе многих важнейших этапов установления первичной структуры белков и нуклеиновых кислот. Достаточно вспомнить метод Эдмана для ступенчатого расщепления пептидов; химический в своей основе метод Максама–Гилберта, совершивший революцию в определении последовательности нуклеотидов (секвенировании) ДНК; метод секвенирования по Сэнгеру, основанный изначально на использовании химически синтезированных дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, и автоматизированный впоследствии благодаря введению флуоресцентных красителей либо в терминаторы, либо в праймеры. Неоценимую роль в изучении биополимеров и их функций сыграла разра-

ботка удобных и эффективных методов химического синтеза полипептидов и олигонуклеотидов. Эти две группы химических подходов нами не рассматриваются, но подразумевается, что при возникновении интереса или необходимости может быть установлена первичная структура любого белка и любой нуклеиновой кислоты и осуществлен химический синтез полипептидов или олигонуклеотидов достаточной длины (десятки или небольшое число сотен мономерных звеньев).

В настоящем обзоре основное внимание уделено использованию химических превращений белков и нуклеиновых кислот для изучения систем матричного биосинтеза. Речь пойдет о трех группах химических методов.

К первой группе относятся методы химического расщепления полимерных цепей в мягких условиях. Естественно, что любой биополимер может быть разрушен до фрагментов при достаточно жесткой обработке. Например, РНК может быть гидролизована до мононуклеотидов в щелочной среде. Однако, в условиях, необходимых для щелочного гидролиза, пространственная структура РНК разрушается. Между тем, в обзоре основное внимание уделяется применению химических подходов для изучения функционально активных биополимеров, для чего необходимо иметь дело с нативным объектом с минимально нарушенной пространственной организацией. Поэтому будут описываться и рассматриваться методы расщепления в мягких условиях, не искажающих пространственную организацию биополимеров и их комплексов. На сегодняшний день эти подходы нашли широкое применение лишь при исследовании нуклеиновых кислот.

Д.Г. Кнорре. Академик, заведующий лабораторией исследования модификации биополимеров НИБХ СО РАН.
Телефон (383–2)35–6441.

Н.В. Кудряшова. Научный сотрудник той же лаборатории.

О.И. Лаврик. Доктор химических наук, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов НИБХ.

Область научных интересов авторов: матричный биосинтез, аффинная модификация и энзимология.

Дата поступления 17 января 1997 г.

Ко второй и третьей группам относятся методы химической модификации биополимеров. Под химической модификацией понимают химические превращения, не приводящие к деструкции основной полимерной цепи. Различают два основных типа химической модификации: группоспецифичную и аффинную модификацию. В первом случае используют реагент, способный модифицировать определенные типы остатков биополимера, чаще всего боковые радикалы аминокислот или гетероциклические основания нуклеиновых кислот.

Во втором случае лиганд, способный к специфическому взаимодействию с биополимером, например субстрат какого-либо фермента, снабжают реакционноспособной группой. За счет сродства (аффинности) к определенному участку нативного биополимера реагент фиксируется на этом участке, и химическое превращение происходит вблизи этого участка.^{1,2}

На методы химической модификации возлагались большие надежды в плане изучения строения и реакционной способности биополимеров.

Так, изучая с помощью группоспецифичного реагента, какие из потенциально способных к модификации остатков биополимера действительно модифицируются, судили о том, какие из них находятся в доступном для реагента положении, т.е. какие из них спрятаны внутри белковой глобулы, а какие принимают участие в образовании водородных связей, формирующих вторичную или третичную структуру нуклеиновой кислоты. Кроме того, сопоставляя степень модификации биополимера таким реагентом со степенью потери биологической активности, судили об участии модифицируемых остатков в функционировании биополимера.

Используя аффинные реагенты, выявляли модифицированный остаток. Считалось, что такой остаток относится к числу образующих активный центр биополимера, или, по меньшей мере, находится вблизи активного центра биополимера.

Для изучения систем, состоящих из нескольких молекул биополимеров (субъединиц), применяли бифункциональные химические реагенты, способные реагировать с двумя функциональными группами биополимеров. Это открывало возможности получения информации о том, какие участки субъединиц находятся на достаточно близком расстоянии друг от друга, позволяющем одной молекуле реагента прореагировать с обоими полимерными компонентами (сшить их в единую структуру).

Однако за последнее десятилетие в физико-химической биологии произошло много изменений, заставивших скорректировать взгляд на возможности и главные задачи методов химической модификации. Так, методом рентгеноструктурного анализа установлена пространственная структура многих ферментов, в том числе и участвующих в процессах матричного биосинтеза. В некоторых случаях установлена также структура комплексов белков со специфическими лигандами или их аналогами, т.е. получены данные о расположении лиганда (субстрата) на белке. Значение отдельных аминокислотных остатков в функционировании белка легко устанавливается с помощью сайт-специфичного мутагенеза — направленной замены методами генной инженерии определенного аминокислотного остатка на любой другой из числа 20, составляющих белки. Поэтому при применении химических подходов к изучению систем матричного биосинтеза нужно учитывать современные возможности как прямых физических методов, так и генной инженерии.

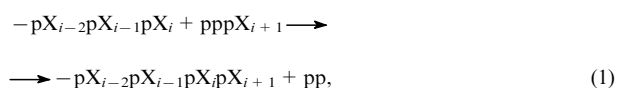
В этой связи наряду с изложением основного материала, полученного с применением химических методов для изучения РНК- и ДНК-полимераз, будет сделана попытка рассмотреть, какие основные возможности и преимущества в

исследовании и практическом использовании систем матричного биосинтеза дают химические подходы. Однако вначале мы остановимся на общих проблемах, которые стоят перед исследователями, работающими в области матричного биосинтеза.

II. Некоторые общие проблемы матричного биосинтеза нуклеиновых кислот[†]

Полимеразы нуклеиновых кислот имеют естественно ряд черт, свойственных многим другим ферментам. Как и любые другие ферменты, они оперируют с определенными субстратами, которыми в данном случае являются растущая полинуклеотидная цепь и нуклеозид-5'-трифосфаты (далее сокращаемые в общем случае и для рибонуклеотидов как NTP, а для дезоксирибонуклеотидов — как dNTP).

Полимеразы имеют активный центр, катализирующий трансферазную реакцию — перенос нуклеотидильного остатка NTP от пирофосфата на 3'-ОН-группу растущей полинуклеотидной цепи. Эта реакция в однобуквенной нуклеотидной символике записывается в виде



где X — нуклеозид, i — индекс, обозначающий положение нуклеозида в полинуклеотидной цепи, p — остаток фосфорной кислоты.

Однако имеется ряд специфических аспектов, которые характерны либо только, либо преимущественно для ферментов матричного биосинтеза. По-видимому, эти аспекты характерны и для биосинтеза белков на рибосомах.

Во-первых, нормальная работа полимераз нуклеиновых кислот требует присутствия матрицы, с помощью которой на каждом звене удлинения цепи отбирается один из четырех присутствующих в системе NTP. Известны четыре типа полимераз нуклеиновых кислот, различающихся химической природой матрицы и субстратов. ДНК-полимеразы катализируют матричный биосинтез полидезоксирибонуклеотидных цепей, используя в качестве матрицы либо ДНК (ДНК-зависимые ДНК-полимеразы, чаще всего называемые просто ДНК-полимеразами), либо РНК (РНК-зависимые ДНК-полимеразы, или обратные транскриптазы). РНК-полимеразы осуществляют биосинтез полирибонуклеотидов, используя в качестве матрицы либо ДНК (ДНК-зависимые РНК-полимеразы, или просто РНК-полимеразы), либо РНК (РНК-зависимые РНК-полимеразы, или РНК-репликазы). Процессы, катализируемые этими ферментами, называются соответственно репликация, обратная транскрипция, транскрипция и РНК-репликация. ДНК- и РНК-полимеразы свойственны всем без исключения живым организмам, и эти ферменты уже на протяжении многих лет являются предметом интенсивных исследований, в том числе химическими методами. В последние годы начались активные исследования обратных транскриптаз, присутствующих в качестве обязательного компонента ретровирусов, к числу которых относится вирус ВИЧ-1, вызывающий заболевание СПИДом.

Отбор нужного мономера на каждой стадии удлинения полинуклеотидной цепи по реакции (1) должен служить сигналом для включения каталитического центра, осуществляющего перенос α -фосфата нуклеотидильного остатка на 3'-ОН-группу растущей цепи. Возможно, это связано с более тонкой подстройкой субстратов к группам каталитического центра фермента в ответ на узнавание правильного субстрата.

[†] Общие вопросы матричного биосинтеза нуклеиновых кислот рассмотрены в работе³.

Во-вторых, на каждом этапе удлинения цепи в процесс отбора вовлекается один определенный нуклеотидный остаток матрицы, работающий как информационный элемент. Активный центр фермента состоит из трех основных участков (рис.1): участка размещения информационного звена матрицы, обеспечивающего отбор нужного на данной стадии мономера (А); участка связывания субстрата в его предреакционной форме (В) и участка размещения 3'-концевого звена растущей цепи, к которому присоединяется новый нуклеотидный остаток (С). При такой схеме акт отбора происходит на стыке участков А и В. Если допустить, что на некоторое время после присоединения нуклеотидного звена участники процесса остаются на своих местах, то создается следующая ситуация: участок С занят предпоследним нуклеотидным остатком удлиненной цепи; участок А занят уже использованным информационным элементом; участок В занят 3'-концевым звеном удлиненной цепи. Резонно считать, что все три участка фермента уникальны. В этом случае для продолжения синтеза необходимо направленное перемещение системы матрица–растущая цепь относительно фермента на одно звено — транслокация. Процесс может произойти либо синхронно с химическим превращением, либо вслед за ним.

В-третьих, инициация синтеза новых полинуклеотидных цепей начинается с определенной стартовой точки. Способ задания этой стартовой точки различен для полимераз разного типа. В случае транскрипции перед осуществлением инициации РНК-полимераза должна оказаться на определенном участке ДНК-матрицы, обычно вне той области, где должна происходить транскрипция. Этот участок называют промотором, если он находится не очень далеко (в пределах десятков пар нуклеотидов) от точки старта, или энхансером, если, как это характерно для эукариот, в дополнение к промотору имеется существенный для инициации транскрипции участок за несколько сотен или даже тысяч пар нуклеотидов от старта. Случайное соударение фермента с промотором представляется маловероятным событием. Поэтому существует проблема поиска промотора (или энхансера) ферментом или специальным вспомогательным белком — фактором транскрипции, который далее способствует правильной посадке РНК-полимеразы вблизи точки старта.

Следует отметить, что во всех изученных случаях инициация происходит только с помощью РНК-полимераз. Ни одного случая инициации с помощью ДНК-полимеразы до настоящего времени неизвестно. Эти ферменты способны только удлинять уже существующую цепь. Поэтому синтез

новых молекул ДНК в клетках начинается с того, что специальный фермент синтезирует короткий рибоолигонуклеотид, который далее удлиняется ДНК-полимеразой, по-видимому, уже с помощью другого активного центра. В эксперименте того же можно добиться, введя в систему короткий дезоксирибоолигонуклеотид, комплементарный некоторому участку матрицы. Этот олигомер далее может удлиниться с помощью ДНК-полимеразы. Такие олигонуклеотиды получили название праймеров, а РНК-полимеразу, создающую РНК-праймер для последующего синтеза ДНК, называют праймазой. После синтеза праймазой короткого фрагмента РНК растущий конец цепи переключается на работу с ДНК-полимеразой. Сказанное относится к клеточным ферментам. Для ферментов, синтез которых программируется вирусными нуклеиновыми кислотами, имеются альтернативные пути. Наиболее интенсивно исследуется инициация синтеза ДНК с помощью обратной транскриптазы ретровирусов. В этом случае геномная РНК вируса захватывает праймер из клетки, причем роль праймера играет одна из тРНК клетки-хозяина, 3'-конец которой комплементарен определенному участку геномной РНК (участок связывания праймера), при этом обратная транскрипция начинается с присоединения остатка dNMP к 3'-концевому рибонуклеотиду праймера.

Все перечисленные аспекты функционирования полимераз — подгонка отобранного с помощью информационного элемента субстрата к каталитическому центру, транслокация, поиск стартовых точек, направленное переключение комплекса матрица–продукт с одного активного центра на другой — являются динамическими событиями. И хотя динамические элементы присутствуют и в функционировании других типов ферментов, можно с уверенностью утверждать, что роль динамики при функционировании матричных ферментов особенно важна.

Вторая специфика матричного биосинтеза (особенно характерная для процессов у эукариот) состоит в том, что транскрипция и репликация проходят в высоко организованной многокомпонентной системе. В случае эукариот такой системой является хроматин. И при транскрипции, и при репликации непосредственно в процессе биосинтеза нуклеиновых кислот участвуют несколько компонентов, которые должны собраться в единый комплекс для осуществления процесса. Например, транскрипции предшествует формирование комплекса матрицы с набором факторов транскрипции. Процессивность репликации (протекание большого числа стадий элонгации без диссоциации комплекса фер-

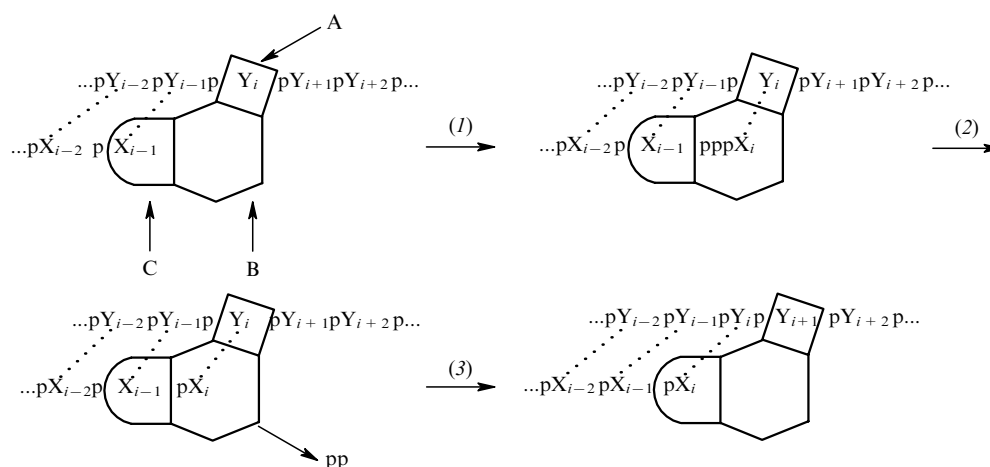


Рис. 1. Схема процессов, происходящих в активном центре матричного фермента при элонгации: Y — информационные элементы матрицы, X — мономерные звенья растущей цепи; pppXi — свободный мономер; А — участок связывания информационного элемента матрицы, В — участок связывания мономера, С — участок связывания конца растущей цепи. 1 — отбор мономера, 2 — образование химической связи, 3 — транслокация.

мент – субстрат) обеспечивается наличием специальных белков-зажимов, препятствующих диссоциации. Знание структуры этих комплексов и динамики их изменений при функционировании матричной системы чрезвычайно существенно для понимания механизма функционирования полимера нуклеиновых кислот в условиях живых организмов.

Еще одной особенностью матричных процессов является то, что матричные системы должны иметь дело с матрицей произвольной первичной структуры. РНК-полимеразы должны взаимодействовать с произвольной транскрибируемой последовательностью, которая перемещается вдоль фермента по мере транскрипции. Есть основания полагать, что синтезируемая РНК некоторое время остается в контакте с ферментом. Если это так, то на ферменте должен существовать некоторый «коридор выхода» продукта транскрипции (рис. 2, участок *f*). ДНК-полимераза взаимодействует с любой матрицей, подлежащей репликации, перемещаясь вдоль нее таким образом, что в активном центре находится лишь информационный остаток матрицы и 3'-конец продукта. Можно ожидать, что какой-то участок еще не реплицированной матрицы, равно как и участок сформировавшегося дуплекса будут находиться на некотором протяжении в контакте с ферментом. Область контакта последнего также можно называть коридором выхода. Поэтому для матричных систем существует проблема определения области неспецифического контакта фермента с матрицей и полимерным продуктом.

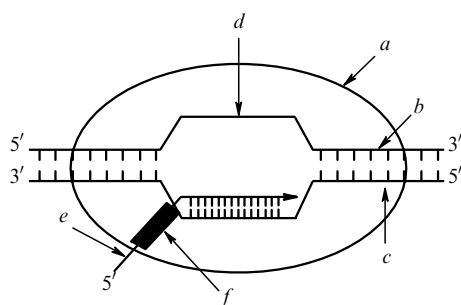


Рис. 2. Схема взаимодействия цепей матрицы и продукта при транскрипции: *a* — РНК-полимераза, *b* — нетранскрибируемая нить ДНК, *c* — транскрибируемая нить ДНК, *d* — временно расплетенный участок ДНК (вздутие), *e* — РНК-продукт (транскрипт), *f* — коридор выхода РНК-продукта.

В матричных процессах в силу протяженности нуклеиновых кислот и наличия, как правило, на молекулах нуклеиновых кислот «особых точек», с участием которых должен произойти определенный каталитический акт (инициация транскрипции, начало репарационного процесса и т.п.), возникает проблема поиска этих особых точек — например, поиск промотора РНК-полимеразой, поиск поврежденной точки ферментами репарации и т.п. В связи с этим еще одной проблемой матричного биосинтеза является установление механизма поиска таких особых точек.

III. Специфические химические подходы, используемые при изучении полимераз нуклеиновых кислот

Большинство задач, возникающих при изучении матричного биосинтеза, требует знания области контакта нуклеиновой кислоты с другими компонентами системы, в первую очередь, с белками. Область контакта в значительной мере защищена от воздействия внешних факторов, в частности, ферментов и химических реагентов. При действии какого-либо реагента на свободный биополимер и на полимер в составе специфического комплекса, в принципе, всегда

можно сопоставить области, модифицируемые в присутствии и в отсутствие других компонентов системы и, тем самым, определить, какая область закрывается этими компонентами. Однако при сегодняшнем состоянии экспериментальных методов такая задача легко решается только для нуклеиновых кислот. Нуклеиновая кислота может быть помечена по одному из концов. Если она обработана эндонуклеазой или реагентом, расщепляющим полинуклеотидную цепь в точке модификации, причем процесс проводится до такой глубины, что в среднем на каждую цепочку приходится один разрыв, то полученная смесь после разделения гель-электрофорезом дает серию полос, соответствующих продуктам расщепления разной длины (считая от меченого конца). При использовании высокорadioактивного фосфора или интенсивной флуоресцентной метки на геле регистрируются только фрагменты, сохранившие меченый конец. Если нуклеиновая кислота не имеет какой-либо особой пространственной структуры, то получается серия полос, соответствующих всем мыслимым точкам разрыва в пределах разрешающей силы электрофоретического метода. Если же в процессе обработки нуклеиновая кислота входила в состав комплекса с белком или несколькими белками, то в пределах области контакта расщепления не происходит, или, по крайней мере, оно является достаточно слабым. В этом случае на серии полос проявляется «белое» пятно, т.е. область, не содержащая радиоактивности или нефлуоресцирующая. Это пятно является отпечатком связанного с нуклеиновой кислотой компонента и называется футпринтом (отпечатком ноги). Естественно, что используемые воздействия не должны влиять на стабильность исследуемого комплекса.

При проведении футпринтинга желательно, чтобы реакция расщепления была мало специфичной по отношению к гетероциклам. Следует отметить, что наряду с химическими реагентами для целей футпринтинга часто применяют ферменты, гидролизующие нуклеиновые кислоты. Чаще всего с этой целью используют ДНКазу I, которая катализирует расщепление внутренних фосфодиэфирных связей, в том числе в двунитевых ДНК, приводя в конечном итоге к образованию набора относительно коротких олигонуклеотидов, а также экзонуклеазу III из *E. coli*, которая катализирует ступенчатое отщепление 5'-нуклеотидов от 3'-конца обеих нитей двунитевой ДНК. Однако разрешающая сила методов, основанных на ферментативном расщеплении, ограничивается размером фермента (чем больше фермент, тем меньше разрешающая способность), составляющим в случае ДНК-полимеразы I ~ 4 нм в диаметре.⁴

Существенно лучшее разрешение достигается при использовании химических реагентов небольшого размера. В последнее время для расщепления ДНК стали широко применять свободные радикалы HO•, генерируемые в системе Fe(EDTA)²⁻/H₂O₂.⁵ Спецификой этого метода является то, что реакция идет по дезоксирибозе, что делает ее неспецифичной к последовательности нуклеотидов. Для изучения полимераз применяется также футпринтинг с помощью KMnO₄.⁶

В принципе, можно получить аналогичный футпринт молекулы белка, взаимодействующей с нуклеиновой кислотой. До последнего времени такие исследования сдерживались отсутствием эффективных методов определения точек модификации белка, что делало эту задачу чрезвычайно трудоемкой. В самое последнее время появилась работа⁷, в которой высокорadioактивная метка была введена в фактор транскрипции TFIIB путем присоединения к С-концу пентапептидного «хвостика» — аргинил-аргинил-аланил-серил-валина, который является мишенью для фосфорилирования с помощью протеинкиназы из сердечной мышцы. Это позволило ввести остаток ³²P-фосфата по ОН-группе серина и затем провести одноударный гидролиз белка с помощью малоспецифичных протеаз с последующим электрофоретическим разделением полученного набора пептидов. Как и при

футпринтинге нуклеиновых кислот, на радиоавтографе проявлялись только пептиды, содержащие С-концевой фрагмент и отличающиеся длиной. Сравнение набора пептидов, полученных из исходного фактора транскрипции и его комплекса с еще одним фактором TAF, позволило выявить область, защищаемую этим фактором от протеолитического расщепления TFIIB.⁷

Наличие стадии элонгации открывает интересные возможности как в способах проведения аффинной модификации, так и в создании реагентов для аффинной модификации. Среди способов проведения модификации особо интересен метод, получивший название сверхспецифичного или компетентного мечения.⁸ Нуклеотиды и их производные в ряде случаев способны взаимодействовать не только с активным центром фермента, но и с рядом других областей на поверхности белка. Известны случаи, когда с молекулой фермента связывается большое число молекул реакционноспособного производного нуклеотида, причем такое взаимодействие не всегда сопровождается потерей активности. Например, фотоаффинная модификация фенилаланил-тРНК-синтазы из *E. coli* γ -*n*-азидоанилидом АТР может приводить к присоединению 20 молекул аналога АТР без потери ферментативной активности.⁹ При матричном биосинтезе возможна ситуация, когда присоединение нуклеотида к белку не препятствует его участию в процессе элонгации. В этом случае, проводя на первом этапе эксперимента модификацию немеченым реагентом, спроектированным в качестве аффинного, а затем добавляя следующий НТР, несущий радиоактивную метку, например α -³²P, можно дискриминировать точку модификации в районе активного центра, поскольку только остаток реагента, ковалентно присоединенный в этом районе, будет подвергаться элонгации и содержать радиоактивную метку. Следует подчеркнуть, что таким способом выявляются не все остатки аффинного реагента, присоединившиеся к ферменту в районе активного центра, поскольку если модификация прошла по остатку, участвующему в каталитическом акте, то элонгация произойти не сможет из-за потери каталитической активности. Однако понятно, что никакие остатки, связавшиеся вне активного центра фермента, даже в функционально значимых точках, выявлены не будут.

При матричном биосинтезе нуклеиновых кислот участниками процесса являются матричная нуклеиновая кислота, вновь синтезируемая цепь нуклеиновой кислоты и соответствующие НТР. Два первых участника — полимерные молекулы. Соответствующие аффинные реагенты можно создать путем синтеза соответствующих олигонуклеотидных фрагментов, моделирующих эти полимеры, или путем модификации самих полимеров. Однако возможно введение химически активных групп и в процессе элонгации. Для этих целей в качестве субстратов используют производные нуклеозид-5'-трифосфатов, несущие реакционноспособные группы. Примером такого субстрата для РНК-полимераз является 5-(4-азидофенилтио)-СТР.¹⁰ В этом случае продукт элонгации содержит реакционноспособную группу и уже является аффинным реагентом по отношению к тому матричному ферменту, который был использован при его синтезе. Оптимальным является такой субстрат, который участвует в акте элонгации, но будучи включенным в 3'-конец цепи не может присоединять следующее нуклеотидное звено. Могут быть использованы также реакционноспособные производные терминаторов, например, при биосинтезе ДНК — дидезоксинуклеозид-5'-трифосфат. В этом случае реакционноспособная группа автоматически окажется фиксированной в районе активного центра фермента.

Как уже отмечалось, на аффинную модификацию возлагаются надежды как на метод, который позволит определить аминокислотные остатки, находящиеся в активном центре фермента и его окрестностях. Но для этого необходимо уметь локализовать модифицированный остаток на поли-

пептидной цепи. Наиболее прямой подход состоит в расщеплении модифицированного белка по специфическим точкам, выделении из полученного набора пептидов того, который содержит модифицированный остаток, и анализе этого пептида ступенчатым расщеплением по методу Эдмана. Появление в ходе этой процедуры необычного производного или останова расщепления на некотором определенном звене свидетельствует, что именно здесь произошла модификация. О природе модификации можно судить, если известен (из независимых экспериментов) продукт взаимодействия модифицируемого остатка с используемым реагентом.

В ряде случаев возможно применение косвенных приемов, позволяющих с той или иной степенью достоверности судить о точке модификации. Такой подход был предложен и широко развит в работах Грачева с соавт.⁸ применительно к локализации модифицированных остатков лизина и гистидина в РНК-полимеразе фосфорилирующими реагентами. Свойства фосфамидов, образующихся при фосфорилировании алифатической ϵ -аминогруппы лизина и имидазольного кольца гистидина, достаточно резко отличаются. Оба фосфамида лабильны в кислой среде, но кинетические характеристики гидролиза различны. Проводя измерение кинетики отщепления присоединенной метки (демодификации), можно сравнить полученные кинетические константы с измеренными для модельных соединений.[‡] В качестве таковых использованы γ -*N*-метиламид АТР и γ -имидазолид АТР. Их константы скорости расщепления при pH 4.9 составляют 0.014 мин⁻¹ при 50°C для амида и 0.016 мин⁻¹ при 20°C для имидазолида, т.е. достаточно резко отличаются. После выявления пептида, в котором находится модифицированный остаток, можно по первичной структуре этого пептида определить, сколько в этом пептиде аминокислотных остатков и в каких положениях они находятся. Если такой остаток, например остаток гистидина, в этом пептиде является единственным, то локализация точки модификации однозначна. При расщеплении модифицированного белка на фрагменты и при использовании тех или иных процедур для разделения смеси пептидов следует, конечно, принимать во внимание стабильность продукта модификации. Ясно, например, что в рассмотренном случае нельзя применять для расщепления белка протеазы, работающие в кислой среде.

В качестве еще одного подхода можно привести использование фотоаффинной модификации остатками бромдезоксисуридина (brdU). Известно, что бромурацил фотохимически реагирует с остатками цистеина, тирозина, фенилаланина и гистидина.¹¹ Используя это свойство, авторы работы¹² исследовали модификацию РНК-полимеразы *E. coli* декануклеотидом T₅brdUT₄, меченным ³²P. Анализ пептидов, полученных последовательным расщеплением бромцианом по остаткам метионина и трипсиновым гидролизом по остаткам лизина и аргинина, показал, что метка содержится в пептиде 721–731 β -субъединицы и пептиде 984–990 β' -субъединицы. Так как каждый из них содержит по одному остатку ароматической аминокислоты, авторы считают, что точками модификации являются соответственно Tyr-726 и Phe-988.¹²

Приведенный пример демонстрирует, сколь важно иметь сведения о химической природе продуктов модификации аминокислотных остатков. К сожалению, для наиболее перспективного подхода, основанного на фотоиндуцированной модификации, в частности, для широко используемого метода прямых фотосшивок нуклеиновых кислот или нуклео-

[‡] Если бы фосфорилирование происходило по остаткам серина, треонина или тирозина, продукты модификации были бы устойчивы в используемом для демодификации диапазоне pH. Таким образом, знание химической природы модифицированного остатка существенно облегчает его локализацию.

тидов с белком, продукты модификации изучены в настоящее время совершенно недостаточно.

IV. Основные стадии транскрипции. Субъединичная структура РНК-полимераз §

До настоящего времени основным объектом детального изучения механизма функционирования РНК-полимераз остается фермент, выделенный из *E.coli*. На этом примере легче всего уяснить, что дают и чего можно ожидать в дальнейшем от химических подходов к изучению транскрипции. Поэтому следует сказать несколько слов о самом ферменте и феноменологии его функционирования.

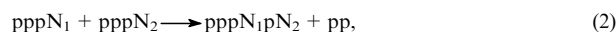
Основной фермент (ядро или кор, от английского core) состоит из трех типов субъединиц — α , β и β' . Причем первая из них присутствует в виде двух копий, так что субъединичная структура фермента записывается в виде $\alpha_2\beta\beta'$. На стадии инициации транскрипции в состав фермента входит также регуляторная σ -субъединица, в результате чего функционирует полный фермент (голофермент) $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Только в этом случае происходит образование правильного комплекса фермента с ДНК в области промотора, чем и определяется точка начала транскрипции.

Уместно напомнить, что номера пар нуклеотидов ДНК при транскрипции идут в порядке возрастания при перемещении вниз, т.е. по направлению движения фермента в ходе транскрипции, причем номер +1 приписывается паре, кодирующей первый нуклеотид транскрипта. В нетранскрибируемой части, расположенной вверх от транскрибируемой, в том числе в промоторе, номера отрицательные, а номер 0 отсутствует. Согласно воззрениям авторов работы¹⁴, транскрипция у прокариот осуществляется в шесть стадий:

1) взаимодействие фермента с ДНК, первоначально, как правило, неспецифичное, но заканчивающееся образованием комплекса фермента с промотором;

2) плавление матричной ДНК в области контакта промотора с ферментом с образованием на двунитевой ДНК локально расплетенной области (вздутия), в результате чего становится возможным переписывание с помощью активного центра фермента содержащейся на транскрибируемой нити информации (в виде последовательности рибонуклеотидов);

3) абортивная инициация, которая начинается с реакции двух рибонуклеозид-5'-трифосфатов (NTP), отбираемых ДНК-матрицей,



и продолжается в соответствии с уравнением (1) до тех пор, пока не завершатся ~10 актов элонгации, после чего происходит отщепление от комплекса σ -субъединицы и резкое упрочнение комплекса (до этого момента сохраняется возможность диссоциации комплекса с выбросом короткого (абортивного) продукта — олигонуклеотида);

4) элонгация, протекающая в прочном комплексе с перемещением фермента и вздутия вдоль ДНК, причем в пределах вздутия 3'-концевой фрагмент вновь синтезированной РНК образует дуплекс с транскрибируемой нитью ДНК (см. рис. 2);

5) встреча фермента с последовательностью нуклеотидов в транскрибируемой ДНК, которая потенциально может способствовать терминации;

6) разложение транскрипционного комплекса с освобождением продукта транскрипции.

Естественно, что активный центр перемещается вдоль транскрибируемой нити, и на участке между началом вздутия и активным центром образуется гибридный дуплекс из

фрагмента транскрибируемой нити и РНК-продукта. В некоторый момент РНК-продукт начинает отделяться от матрицы, при этом матрица воссоединяется с нетранскрибируемой нитью. В то же время перед перемещающимся вдоль транскрибируемой нити активным центром продолжается раздвижение нитей ДНК.

В последние годы стали появляться работы, посвященные изучению химическими методами эукариотических РНК-полимераз. Эти ферменты устроены существенно сложнее, чем фермент из *E.coli*. Они состоят примерно из десятка различных субъединиц. Кроме того, в ядрах функционируют три различные РНК-полимеразы, чаще всего обозначаемые как РНК-полимеразы I, II и III. Для дрожжей соответствующие ферменты обозначают латинскими буквами А, В и С. Эти ферменты ответственны соответственно за транскрипцию генов рибосомной РНК, генов информационных РНК и генов, кодирующих различные малые РНК, в том числе транспортные и рибосомные 5S РНК. Субъединичный состав некоторых, наиболее интенсивно исследуемых ферментов приведен в табл. 1. Важной отличительной чертой эукариотических ферментов является необходимость участия в процессе инициации транскрипции специальных факторов транскрипции. По имеющимся данным функционально значимое взаимодействие всех трех РНК-полимераз с ДНК начинается с образования комплекса ДНК с набором факторов транскрипции, специальным для каждой из трех полимераз.

Таким образом, с помощью химических методов решаются (или могут быть решены) следующие задачи. Первая — установление природы субъединиц, взаимодействующих с ДНК, и исследование динамики первичного взаимодействия фермента с ДНК. Эти вопросы могут быть решены методом прямой фотосшивки. Вторая — установление области ДНК, взаимодействующей с ферментом на разных фазах транскрипции, что может быть сделано с помощью футпринтинга. Третья — определение размера и положения относительно фермента «вздутия», перемещающегося вдоль ДНК, которые могут быть установлены путем выявления остатков ДНК, не участвующих в Уотсон–Криковских взаимодействиях. Четвертая — установление субъединиц, участвующих во взаимодействии с нитями ДНК в области вздутия, со вновь синтезированной РНК до и после ее отделения от матричной ДНК (установление коридора выхода), с субстратами (NTP). Последний круг вопросов может решаться с помощью аффинного мечения компонентов соответствующими реакционноспособными аналогами, в том числе с применением компетентного мечения или путем прямой фотосшивки при УФ-облучении. Для достаточно стабильных продуктов становится возможным установление положения взаимодействующих аминокислотных остатков путем идентификации модифицированных аминокислот. В этом случае получают сведения об отдельных элементах активного центра фермента. Для эукариотических ферментов к этим задачам добавляется изучение области ДНК, взаимодействующей с факторами транскрипции, а также взаимодействие последних с самим ферментом. Рассмотрим последовательно основные результаты, полученные при применении химических подходов к решению этих вопросов.

V. Взаимодействие РНК-полимеразы и ее субъединиц с ДНК

Первые эксперименты по изучению взаимодействия РНК-полимеразы с ДНК были проведены с использованием простейшего по исполнению химического метода — метода прямых фотосшивок. Облученную УФ-светом (обычно с $\lambda = 254$ нм) смесь ДНК и фермента обрабатывают соответствующими нуклеазами, после чего в связанном с ферментом виде сохраняются лишь небольшие фрагменты пришитой ДНК. Субъединицы фермента разделяют гель-электро-

§ Основные понятия см. в работе¹³.

Таблица 1. Субъединичный состав эукариотических РНК-полимераз (в кДа).

Дрожжи			Проростки пшеницы	Тимус теленка		Клетки HeLa человека		Дрозофила	
A	B	C	I	I	II	I	II	I	II
190	220	160	180		210	197	240	195	175
	185				180		214		
135	150	128	140–150		145	140	180	125	135
		82				126			
49	53			51		52		48	
43	44.5			44	44			41	
40		40			36			38	
34.5	32	31	30						
27	27	27		25	25			25	
23	23	23			20				
19		19			18			18.5	
	16.5			16.5	16				
					15				
					12				
					11.5				

форезом и по положению радиоактивно меченых полос определяют, какие из субъединиц ковалентно связались с ДНК при облучении. Можно также обработать облученную смесь ферментами рестрикции, расщепляющими ДНК по строго определенным участкам, осадить с помощью анти-тел к РНК-полимеразе те фрагменты, которые содержат ковалентно связанный фермент, удалить фермент из осаж-денных фрагментов обработкой соответствующей протеин-азой и, разделив их гель-электрофорезом, по положению полос найти, какие из фрагментов и в каком количестве сшили с РНК-полимеразой при облучении.

Результаты первого исследования такого рода приведены в работе¹⁵. Отмечается, что при смешивании избытка фер-мента с меченной ³H ДНК фага Т7 и последующем УФ-облучении смеси основная часть фермента связывается вне промоторов, т.е. неспецифически. Если же перед облуче-нием добавить к смеси избыток немеченой ДНК, то в течение достаточно длительного времени комплексы меченой ДНК с промоторами будут сохраняться, а в неспецифических комплексах произойдет замена меченой ДНК на немеченую, так что при УФ-облучении радиоактивность сохранится только в специфических комплексах. Таким образом было установлено, что в неспецифическом взаимодействии участвуют три субъединицы — β , β' и σ , а в образовании специфических комплексов — только β и σ . В обоих случаях отсутствует взаимодействие с субъединицей α .

С использованием ДНК, в которой тимин замещен на бромурацил, дающий более стабильные продукты сшивки, было показано,¹⁶ что в одной из сшивок в σ -субъединице участвует третий вверх от стартовой точки гетероцикл (пара — 3), а в β -субъединице — пара + 3.

Близкие результаты, в принципе согласующиеся с приве-денными по фотосшивкам, были получены при сшивке фермента с ДНК с помощью формальдегида.¹⁷ Для этих целей был использован прием, разработанный Мирзабеко-вым¹⁷ для исследования взаимодействия ДНК с гистонами в хроматине. Он основан на неглубокой апуринизации ДНК (отщепление пуриновых гетероциклов от некоторых нуклео-тидных остатков с образованием открытой формы дезокси-рибозы). Альдегидные группы такой ДНК могут взаимодействовать с близко расположенными ϵ -аминогруп-пами остатков лизина с образованием оснований Шиффа, которые легко превращаются в прочные алкиламины обра-боткой боргидридом натрия. С использованием этого метода была получена¹⁸ наиболее детальная картина сшивки РНК-полимеразы с промоторным участком lac UV5.

Описаны также результаты модификации РНК-полиме-разы *E.coli* алкилирующим производным олигонуклеотида, несущим на 5'-концевом фосфате остаток 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензиламина и имеющим последователь-ность, соответствующую фрагменту от —13 до —2 нетран-скрибируемой нити ДНК, содержащий *spc*-промотор. Установлено, что сам олигонуклеотид имеет высокое срод-ство к ферменту, что может свидетельствовать в пользу механизма расплетения двунитевой ДНК в области промо-тора за счет преимущественного связывания нетранскриби-руемой нити и, соответственно, освобождения транскриби-руемой нити. Алкилирующее производное этого олиго-нуклеотида модифицирует σ -субъединицу. В этой работе описано также не нашедшее пока удовлетворительного объяснения явление эффективного связывания октарибонук-леотида, комплементарного участку от —13 до —6 нетран-скрибируемой нити, с ферментом; при этом алкилирующее производное октарибонуклеотида модифицирует β, β' -субъ-единицы.¹⁹

Динамика сшивания фермента с ДНК была изучена с использованием специальной установки для быстрого смеши-вания и последующего облучения через определенный про-межутки времени мощным коротким (10 мкс) импульсом УФ-света.²⁰ С этой целью анализировали распределение пришитого фермента между восемью различными участ-ками ДНК, которые получались в результате высокоспеци-фичной фрагментации ДНК с помощью ферментов рестрикции Kpn I и Mbo I. Найдено, что при таком расщеп-лении три главных промотора ДНК фага Т7 попадают в один фрагмент. В первые десятки миллисекунд распределение было близко к статистическому, т.е. количество связанной с фрагментом РНК-полимеразы хорошо коррелировало с размером фрагмента. Затем постепенно происходило пере-распределение фермента между фрагментами с постепенным накоплением фермента во фрагменте, содержащем промо-тор. Это позволило определить константу скорости реакции образования первичных неспецифических комплексов и кон-станту скорости перемещения ДНК в направлении промо-тора. Характер этого перемещения согласуется с меха-низмом перемещения с помощью одномерной диффузии вдоль ДНК.

Область контакта РНК-полимеразы *E.coli* с ДНК много-кратно изучали с помощью футпринтинга. Исследовались комплексы, образованные с промотором в отсутствие тран-скрипции и в процессе транскрипции. В первом случае удалось зарегистрировать и охарактеризовать три состояния

комплекса — закрытое, промежуточное и открытое. Лучшие результаты были получены с использованием ОН-радикалов.²¹ В закрытом комплексе, образующемся при 4°C, защищенной ферментом от действия радикалов областью является область от -4 до -53, причем с периодичностью, соответствующей спиральной структуре ДНК, попеременно оказываются защищенными то транскрибируемая, то нетранскрибируемая нить. Этот факт свидетельствует о том, что в этой области в контакт с ферментом вступает лишь одна сторона ДНК. При образовании промежуточного комплекса (20°C) имеет место полная защита витков спирали ДНК, причем наблюдается полная защита нетранскрибируемой нити на участке от -10 до +21 и транскрибируемой нити на участке от -13 до +18. Ранее²² этот участок было предложено называть доменом плавления, в то время как расположенную вверх от него область неполного контакта — доменом узнавания. Следует подчеркнуть, что домен плавления не совпадает с расплавленной областью ДНК, т.е. с размером вздутия, которое входит в состав этого домена, т.е. является существенно меньшим. Часть ДНК в составе домена плавления, примыкающая к вздутию, еще (справа) или уже (слева) находится в двунитевой форме. Наконец, при 37°C, когда образуется открытый, транскрипционно активный комплекс, область контакта с нетранскрибируемой нитью сохраняется, а на транскрибируемой нити возникает доступный для модификации участок в области от -7 до +2.

VI. Исследование участка ДНК, расплетенного в комплексе с РНК-полимеразой (вздутия)

При изучении транскрипции с помощью футпринтинга удается зарегистрировать перемещение краев вздутия. Так, при транскрипции с промотора *lac UV5*, первые транскрибируемые нуклеотиды которого образуют последовательность ТТААСА..., в комплексе с ферментом или с ферментом и праймером АрА, имитирующим первые два шага транскрипции, остаток С в положении +5 не алкилируется диметилсульфатом, в то время как после добавления dTTP, элонгирующего субстрат еще на два звена, этот же остаток С становится доступным алкилированию.²³

Дальнейшие исследования потребовали получения серии транскрипционных комплексов с разной длиной транскриптов. Этого удалось достичь с использованием благоприятных для этой цели нуклеотидных последовательностей в транскрибируемой части ДНК. Например, в работе²² транскрипцию проводили с фрагмента Т7 ДНК с последовательностью (3')T(+1)AGCTCTCCCTGTGCCGCTTA...(5') на транскрибируемой нити. При проведении транскрипции с использованием тринуклеотида АУС в качестве праймера и субстратов АТР и ГТР синтез доходит до 11-го звена, так как из-за отсутствия в смеси СТР следующий шаг не может осуществиться. Аналогично, проводя транскрипцию в присутствии СТР, АТР и ГТР можно получить транскрипционный комплекс с длиной транскрипта 20, поскольку в отсутствие УТР не может произойти 21-й шаг синтеза. Изменяя путем введения мутаций последовательности нуклеотидов в ДНК, можно получать транскрипционные комплексы с самой разнообразной длиной вновь синтезированной РНК. В работе²² с помощью футпринтинга ОН-радикалами было установлено, что при достижении транскриптом длины в 11 звеньев наблюдается разрушение контакта фермента с доменом узнавания без изменения размера домена плавления. Однако дальнейшее увеличение длины транскрипта приводит к уменьшению домена плавления от ~30 звеньев до 23. Разрушение контактов фермента с доменом узнавания после достижения транскриптом длины 11 звеньев зарегистрировано также путем футпринтинга с помощью системы Cu^{2+} - 1,10-фенантролин.²⁴

Более универсальный прием основан на иммобилизации РНК-полимеразы на носителе.²⁵ Используя ступенчатую

элонгацию (пропускание на каждой стадии одного из четырех субстратов), удалось получить транскрипционные комплексы с разной длиной транскрипта. Длина транскрипта для каждого такого комплекса дает положение каталитического центра фермента, а футпринтинг (в данной работе использовали экзонуклеазу III) — нижнюю точку контакта ДНК с ферментом. Систематические измерения расстояния между этими двумя точками показали, что транскрипция в основном идет непрерывно, т.е. на каждый шаг перемещения активного центра фермента граница области взаимодействия ДНК-фермент перемещается на единицу. Однако в некоторых случаях оказалось, что перемещение активного центра самого фермента не приводит к перемещению фермента относительно матрицы, и после нескольких таких шагов фермент как бы совершает скачок через несколько пар нуклеотидов матрицы.

Скачкообразное перемещение фермента было зарегистрировано также в работе²⁶, выполненной с применением более тонкой химической техники. В этой работе была получена серия транскрипционных комплексов с длиной транскрипта от 11 до 20 нуклеотидов. Эти комплексы получались транскрипцией на фрагменте ДНК, содержащем промотор и последовательность первых 20 транскрибируемых нуклеотидов (3')d(TAGCTCTCCCTGTGCCGCTT...)(5'). Для получения набора комплексов транскрипцию инициировали с помощью рибонуклеотида рАУС с использованием в качестве субстратов ГТР и АТР. В этой системе получали комплекс с длиной транскрипта 11 звеньев (комплекс 11). После его выделения с помощью гель-фильтрации и добавления СТР получали комплекс 12, а после добавления СТР и АТР — комплекс 14. В присутствии ГТР комплекс 14 превращался в комплекс 16, в присутствии СТР + ГТР — в комплекс 18, а в присутствии СТР + ГТР + АТР — в комплекс 20. Положение развернутого участка ДНК (вздутия) определяли с использованием трех реагентов, каждый из которых специфичен к одному типу гетероциклов: с помощью OsO_4 определяли тимин, с помощью диэтилпирикарбоната — аденин, а с помощью диметилсульфата с последующей обработкой гидразином — цитозин. Эти исследования в сочетании с футпринтингом ОН-радикалами показали, что вплоть до комплекса 18 включительно идет разворачивание двойной спирали перед РНК-полимеразой, при этом положение верхнего контакта ДНК с ферментом не изменяется. После достижения транскриптом длины 20 звеньев происходит скачок и спираль закрывается, переходя в двунитевое состояние.

Изменение размера области контакта матрицы с РНК зарегистрировано для транскрипционных комплексов с РНК-полимеразой II из тимуса теленка с транскриптами длиной в 135, 138 и 143 нуклеотидов. Футпринтинг с помощью ДНКазы I показал, что размеры защищаемых от гидролиза участков составляют соответственно 48, 55 и 51 пару нуклеотидов.²⁷

VII. Исследование коридора выхода РНК

Чтобы проследить путь перемещения 5'-конца образующегося транскрипта, используют два основных подхода. Один из них основан на введении реакционноспособной группы в иницирующий субстрат или праймер. Первые эксперименты такого рода были описаны в работах^{28,29}, в которых в качестве одного из субстратов использовали γ -*n*-азидоанилид АТР. Последний может служить как для инициации, так и для элонгации. Естественно, что фотоактивный остаток γ -*n*-азидоанилина сохраняется только на 5'-конце транскрипта. Фотомодификация зарегистрирована только в β - и σ -субъединицах. Более детальное исследование транскрипта с использованием этого приема было выполнено в работе³⁰, в которой на матрице поли[d(A-T)] была проведена транскрипция РНК-полимеразой *E. coli* с использованием меченого

[α - 32 P] АТФ и праймера, содержащего фотоактивную метку p -N $_3$ C $_6$ H $_4$ C(O)CH $_2$ SP(O)(O $^-$)AdoPUrd. После проведения транскрипции транскрипционный комплекс облучали, меченые субъединицы разделяли, отделяли диализом от субстратов и обрабатывали PheHgOAc для отщепления метки от транскрипта. Транскрипты разделяли электрофорезом и радиоавтографировали. Это позволяло определить для каждой субъединицы, сколько транскрипта определенной длины связалось с субъединицей. Найдено, что транскрипты длиной 6–8 звеньев преимущественно модифицируют ДНК, длиной 9–12 — σ -субъединицу, длиной 13–19 — β/β' -субъединицы.³¹

Второй прием основан на предположении, что вновь синтезированная РНК в пределах вздутия матричной ДНК находится в виде дуплекса с транскрибируемой нитью ДНК. В этом случае ее можно промоделировать олигонуклеотидом, комплементарным нескольким остаткам открытой части транскрибируемой нити и несущим на 5'-конце реакционноспособную группу. Это было выполнено на участке мотора A2 ДНК фага T7, который в комплексе с РНК-полимеразой *E. coli* образует на транскрибируемой нити открытый участок (3')d(ATGTTAGCGA), причем первые семь остатков относятся к нетранскрибируемой области (т.е. соответствуют номерам от –7 до –1), а остаток dC является первым транскрибируемым нуклеотидом.

Была приготовлена серия производных олигонуклеотидов, комплементарных открытому участку, общей структуры R(pdN) $_n$ pTprC с 3'-концевым динуклеотидом, комплементарным фрагменту A(–2)G(–1) (первая группа реагентов), и R(pdN) $_n$ pdGprC с концевым динуклеотидом, комплементарным фрагменту C(+1)G(+2) (вторая группа реагентов), где R — реакционноспособная группа. Группа R содержала либо остаток бензальдегида (см. выше), либо фрагмент ароматического 2-хлорэтиламина, способный алкилировать нуклеофильные центры белков и нуклеиновых кислот, либо радикал, активирующий фосфат, например *N*-метилимидазол. После проведения аффинной модификации с помощью первой группы реагентов в реакционную смесь добавляли [α - 32 P]GTP и проводили компетентное мечение, т.е. вводили метку в ковалентно связанный с ферментом олигонуклеотид. В случае второй группы реагентов для проведения компетентного мечения добавлялся [α - 32 P]UTP. Далее изучалось распределение радиоактивности по субъединицам и определялось (с использованием описанных выше критериев, основанных на кинетике демодификации продуктов фосфорилирования) наличие модификации (по остаткам гистидина и лизина). В случае алкилирующих реагентов наблюдалась также модификация ДНК. Распределение и природа меченого аминокислотного остатка существенно отличались для реагентов с разной длиной олигонуклеотидной части, т.е. с разным расстоянием химически активной группы от пары G·C(+1). На рис. 3 представлены результаты определения «коридора выхода», полученные с помощью первой группы реагентов.³² Данные, полученные при использовании второй группы реагентов,³³ качественно сходятся с представленными на рис. 4 для реагентов первой группы. Однако имеются и отчетливые различия. Например, первой группой реагентов σ -субъединица модифицируется как по остаткам лизина, так и по остаткам гистидина, причем R не может быть присоединен ближе, чем к остатку, образующему пару –7. В то же время при применении второй группы реагентов модификацию остатков гистидина в σ -субъединице наблюдали уже при модификации гексануклеотидом ($n = 4$).

Описано также определение коридора выхода РНК для РНК-полимеразы II человека (клетки HeLa), основанное на фотоаффинной модификации фермента с помощью транскрипта, в который в ходе транскрипции вводились остатки 4-тиоуридинмонофосфата (s⁴UMP). Длина транскриптов регулировалась введением в реакционную смесь

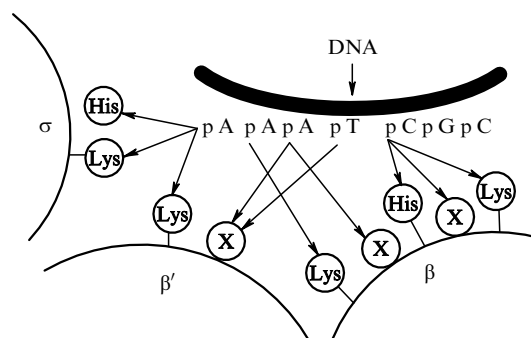


Рис. 3. Топография коридора выхода РНК-продукта, полученная с помощью мечения транскрипционного комплекса РНК-полимеразы *E. coli* реагентами, содержащими альдегидные и алкилирующие группировки, и фосфорилирующими производными олигорибонуклеотидов. Стрелками указаны взаимодействия реакционно-способных группировок реагентов с аминокислотными остатками белка — Lys, His и X (X — аминокислотный остаток, отличный от лизина и гистидина).

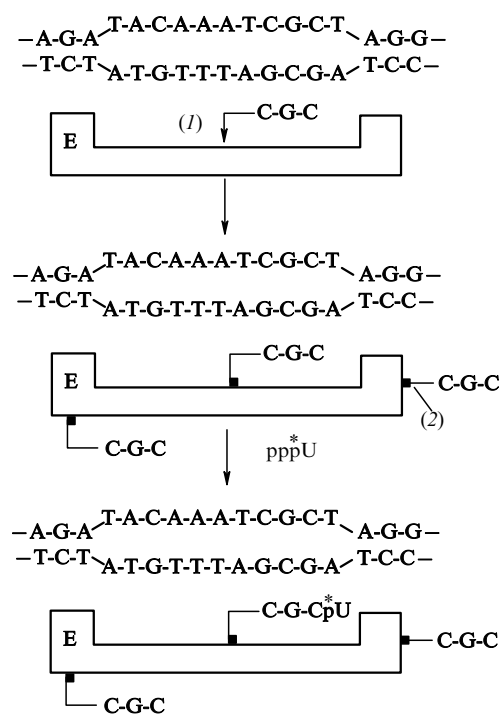


Рис. 4. Схема высокоселективного аффинного мечения РНК-полимеразы. 1 — фосфорилирующий остаток, 2 — место присоединения фосфорилирующего остатка к белку.

3'-CH $_3$ O—GTP в качестве терминатора. Модификации в основном подвергались большие субъединицы массой 240 и 140 кДа.³⁴ При этом оказалось, что для достаточно эффективной модификации длина транскрипта должна составлять не менее 16 нуклеотидных остатков. Это позволяет судить о расстоянии между активным центром и началом выхода транскрипта из дуплекса, образуемого транскрибируемой нитью ДНК и продуктом транскрипции.

Этот прием удалось использовать также для выявления субъединиц, контактирующих с транскриптом, образующимся в изолированных ядрышках, в которых с помощью РНК-полимеразы I происходит транскрипция генов рибосомной РНК. С этой целью в ядрышки клеток HeLa вводили s⁴UTP и меченый СТР и через некоторое время проводили облучение. Анализ радиоактивности, связанной с выделенной из облученных ядрышек РНК-полимеразой I, показал,

что в первую очередь модифицируются субъединицы массой 200 и 120 кДа. По мере увеличения размера транскрипта возрастает доля транскрипта, ковалентно связавшегося с субъединицей массой 52 кДа.³⁵

Эта же система была использована для локализации РНК-полимеразы II в ядре. Было установлено, что после облучения ядер, в которых проходила транскрипция с участием s⁴UTP и меченого СТР, молекулы фермента связываются не с ядерным матриксом, а двигаются вдоль петель, образуемых хромосомной ДНК.³⁶

VIII. Подходы к изучению активного центра РНК-полимераз методом аффинной модификации

Большая часть информации об аминокислотных остатках фермента, участвующих в формировании активного центра или прилежащих к нему, получена с помощью описанного выше метода высокоселективного мечения. Этим способом был изучен иницирующий район РНК-полимераз из разнообразных источников, таких как фермент, продуцируемый фагом Т7,³⁷ три дрожжевые РНК-полимеразы,³⁸ РНК-полимераза II из плаценты человека³⁹ и из проростков пшеницы.⁴⁰ В этих работах в качестве аффинного реагента использовали производные иницирующего пуринового нуклеотида, содержащего на 5'-конце остаток бензальдегида и образующего основание Шиффа с ε-аминогруппой лизина. Основание Шиффа восстанавливали боргидридом до алкиламина, а затем проводили элонгацию с помощью меченого [α-³²P]NTP. В качестве аффинного реагента для модификации района инициации транскрипции применяли аденозин-5'-триметафосфат. В случае эукариотических ферментов мечению подвергалась вторая по величине субъединица. В случае Т7 РНК-полимеразы модификации подвергается остаток лизина 631.⁴¹ В РНК-полимеразе из *E.coli* точками модификации оказались остатки лизина 1065 и гистидина 1237 β-субъединицы.⁴² В РНК-полимеразе II из дрожжей модификации подвергались остатки лизина 979 и 987.⁴³

Метод компетентного мечения в силу его высокой селективности можно применять также в клеточных экстрактах. И хотя это было сделано на РНК-репликазе (которую мы не рассматриваем из-за скудости материала),⁴⁴ мы сочли целесообразным привести пример выявления функции двух неструктурных белков вируса клещевого энцефалита, поскольку он демонстрирует возможности использования данного подхода в сложных надмолекулярных системах. На 3'-конце плюс-цепи вирусной РНК, с которого должна начинаться репликация для образования двунитевой репликативной РНК, имеется последовательность UUC(3'). Реакционноспособный аналог, с которого может начинаться репликация, должен быть производным GMP. При компетентном мечении элонгация должна осуществляться с помощью [α-³²P]АТР. При введении этих компонентов в экстракт клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных вирусом, через 8 ч после инфекции радиоактивная метка была обнаружена в белке с молекулярной массой 69 кДа, что, судя по структуре вирусной РНК, соответствует неструктурному (т.е. не входящему в состав зрелого вируса) белку NS3. В экстракте, полученном из клеток, выделенных через 45 ч после начала инфекции и подвергнутых той же обработке, метка содержалась в другом неструктурном белке NS5 с молекулярной массой ~100 кДа. В соответствии с логикой событий, характерной для РНК-содержащих вирусов, можно полагать, что белок NS3 участвует в репликации однонитевой РНК, необходимой для превращения РНК-вируса в двунитевую форму, а NS5 — в репликации двунитевой РНК, необходимой для накопления новых плюс-цепей, входящих в состав новых вирусных частиц.

Для прямой модификации NTP-связывающих центров были предложены также 5-азидо-UTP⁴⁵ и 8-азидо-АТР.⁴⁶

Первый оказался субстратом фермента из *E.coli* с $K_m \sim 80$ мкМ. Фотооблучение фермента в присутствии этого реагента приводит к примерно одинаковому включению метки в β-, β'- и σ-субъединицы, причем присутствие ДНК не влияет на распределение метки между субъединицами. 8-Азидо-АТР является плохим субстратом для этого фермента, однако он конкурентно (по отношению к АТР) ингибирует фермент. Фотоаффинная модификация в основном приводит к модификации β'- и σ-субъединиц. При включении аналога в 3'-концевое положение транскрипта и последующем облучении происходит модификация β'-субъединицы в пределах пептида 932–1020.⁴⁷ 8-Азидо-АТР был также применен для фотоаффинной модификации РНК-полимеразы, кодируемой фагом Т7,⁴⁸ и РНК-полимеразы II из тимуса телят.⁴⁸ В этих двух работах выделены пептиды, содержащие присоединенную фотометку.

Аффинная модификация позволяет зарегистрировать перемещение субстрата в пределах одной молекулы фермента или между субъединицами. В качестве примера можно привести работу⁵⁰, в которой наблюдали превращение транскрипционно активного комплекса, образованного ферментом из *E.coli*, в неактивный при прекращении транскрипции из-за отсутствия субстрата для следующего шага элонгации. Это превращение происходит при инкубации системы в течение нескольких десятков минут при 37°C и является необратимым, т.е. добавление субстрата уже не приводит к продолжению транскрипции. Комплекс получали путем ступенчатой элонгации на иммобилизованном ферменте²⁵ и он содержал на 3'-конце фотоактивный остаток 4-тио-UMP. Комплекс облучали при 360 нм. Анализ модификации субъединиц показал, что в транскрипционно активном комплексе происходит модификация β-субъединицы в пределах пептидов 515–660 и 1091–1107 и β'-субъединицы в пределах пептида 400–465; в неактивном комплексе модифицируется только β'-субъединица в пределах пептида 1091–1107.

В последнее время разработаны другие, менее традиционные подходы к изучению активных центров РНК-полимераз. Так, в работе⁵¹ предложено комбинировать химический и генетический подходы для установления района связывания иона Mg^{2+} в активном центре фермента с заменой иона Mg^{2+} на Fe^{2+} . Было найдено, что в этом случае происходит окислительная деструкция как матрицы, так и фермента. Оказалось, что деструкция затрагивает в основном β'-субъединицу, причем расщепление проходит в пределах пептида, расположенного между остатками метионина 466 и 400. Так как на этом участке расположена консервативная последовательность (т.е. характерная для самых разнообразных полимераз нуклеиновых кислот) NADFDGD (в однобуквенных обозначениях соответственно N — аспарагин, A — аланин, D — аспартат, F — фенилаланин, G — глицин), то сделано заключение, что этот фрагмент принимает участие в связывании иона магния. В качестве дополнительного подтверждения места расщепления методом белковой инженерии был получен мутантный вариант РНК-полимеразы, в котором β'-субъединица содержала на том же месте последовательность NAAFAGA (остатки аспартата заменены на остатки аланина). С этим фрагментом при замене иона Mg^{2+} на Fe^{2+} расщепления фермента не происходило. В том же эксперименте наблюдалось расщепление матричной ДНК по строго определенным участкам в положениях –1 и –2 от стартовой точки транскрипции.

Описано⁵² использование для аффинной модификации химерного реагента, представляющего собой конъюгат иницирующего субстрата АТР с антибиотиком — рифампицином. Этот антибиотик является сильным ингибитором прокариотических РНК-полимераз, в связи с чем он является эффективным противотуберкулезным препаратом. Была приготовлена серия конъюгатов с различной длиной

спейсера —NH—(CH₂)_n—NH—, соединяющего карбоксильную группу антибиотика с γ-фосфатом АТР. Оказалось, что при длине линкера $n > 3$ конъюгат служит иницирующим субстратом транскрипции, при этом оптимальная длина спейсера соответствует $n = 5$. Известно, что рифампицин очень прочно связывается с ферментом. Это означает, что расстояние между центром связывания антибиотика и иницирующего субстрата составляет ~1.5 нм.

Был также синтезирован и испытан конъюгат, в состав спейсера которого входила алкилирующая группа —NH(CH₂)₂N(C(O)CH₂Br)(CH₂)₆—. В этом случае зарегистрирована модификация транскрибируемой нити ДНК в положениях C(–3) и G(–2).

Авторы применили также прием, названный ими псевдоферментативной реакцией. С этой целью к карбоксильной группе рифампицина присоединяли алкилирующий фрагмент —NH(CH₂)_nNHC(O)CH₂Br, а в реакционную смесь, содержащую фермент и производное рифампицина, вводили аналог АТР, содержащий при γ-фосфате атом серы вместо одного из атомов кислорода. При благоприятном расположении этих соединений в соответствующих активных центрах наблюдалось алкилирование тиааналога АТР. Наиболее эффективное алкилирование наблюдалось при $n = 4$, что соответствует размеру спейсера с шестью атомами С.

Нуклеозидтрифосфаты могут функционировать в процессе транскрипции не только как субстраты процесса полимеризации. При исследовании фотоаффинной модификации РНК-полимеразы II из тимуса телят с помощью 8-азидо-(1'-нафтилсульфонил)-[α-³²P]-АТР было установлено, что при ковалентном присоединении одного остатка реагента происходит модификация, сопровождающаяся полной инактивацией фермента. Инактивация проходит конкурентно по отношению к АТР. Однако другие субстраты —СТР и ГТР— не являются конкурентными ингибиторами по отношению к реагенту, и, следовательно, модифицируемый участок не является местом связывания субстрата. Так как известно, что для инициации транскрипции РНК-полимеразой II необходим гидролиз одной молекулы АТР, предполагается, что модификация проходит по специфическому сайту связывания АТР, в котором происходит необходимый для инициации гидролиз.⁵³ Используя флуорофор 2'-O-дансил-АТР, который, по мнению авторов, дает с модифицированным ферментом комплекс в участке связывания субстрата, путем измерения резонансного переноса энергии удалось определить расстояние между центрами связывания АТР и других субстратов, которое оказалось равным ~2.5 нм.

Все описанные выше методы приводят к мечению фермента в области связывания НТР. Имеются отдельные работы, в которых была предпринята попытка связать фермент с 3'-концом растущей цепи РНК. Описан⁵⁴ синтез нескольких коротких транскриптов, в 3'-конец которых был введен остаток s⁴UMP. С этой целью были использованы короткие одностранные матрицы общего строения (3')d(CCCCCGCTTGTGGTG-X), где X = A, TA, TTA или TTAA, которые транскрибировались с помощью РНК-полимеразы I дрожжей в присутствии праймера GrCrG и трех субстратов: АТР, [α-³²P]СТР и s⁴UTP (подчеркнута транскрибируемая часть матрицы). Нетрудно заметить, что транскрипция начиналась с места расположения 3'-конца праймера и, поскольку на транскрибируемой нити находился единственный остаток dA, расположенный на 5'-конце матрицы, в 3'-конец транскрипта включался единственный остаток s⁴UMP, кодируемый этим dA. Полученные транскрипты длиной 12–15 нуклеотидных остатков после завершения процесса оказывались в составе транскрипционных комплексов, содержащих фермент, матрицу и транскрипт с фотоактивным остатком, локализованным в районе активного центра. Облучение приводило к присоединению радиоактивной метки к двум субъединицам с молекулярными массами

190 и 135 кДа. Неожиданным и не нашедшим убедительного объяснения оказалось изменение соотношения между уровнем радиоактивности двух субъединиц в зависимости от длины транскрипта, хотя, казалось бы, во всех исследованных системах фотоактивный остаток всегда находился в одном и том же положении на ферменте, соответствующем 3'-концу транскрипта.

Этот же подход с тем же набором матриц и меченых по 3'-концу транскриптов был использован для аффинной модификации РНК-полимеразы II из дрожжей и проростков пшеницы. В обоих случаях аффинная модификация приводила к включению радиоактивности только в самую большую субъединицу (220 кДа — для дрожжевого фермента и 180 кДа — для фермента из проростков пшеницы).⁵⁵

IX. Исследование взаимодействия эукариотических факторов транскрипции с ДНК

Для каждой из трех эукариотических РНК-полимераз имеется свой набор факторов транскрипции, участвующих в стадии инициации транскрипции. В соответствии с номером полимеразы их обозначают как TFI, TFI и TFI. В пределах каждого набора их дополнительно обозначают латинскими буквами. Большинство факторов состоит из нескольких субъединиц. При транскрипции генов информационных РНК в инициации участвует набор основных факторов, необходимый для транскрипции любых генов, а для включения в работу целого ряда генов необходимы дополнительные высоко специализированные факторы. К числу основных факторов относятся TFI, TFI, TFI, формирующие первичный комплекс в непосредственной близости от участка ДНК, содержащего последовательность d(TATA) на небольшом расстоянии вверх от точки начала транскрипции, а также факторы TFI, TFI, TFI и TFI. Одна из субъединиц последнего фактора является протеинкиназой и катализирует фосфорилирование большой субъединицы РНК-полимеразы, что необходимо для появления ферментативной активности.

На рис. 5 приведена схема расположения субъединиц факторов TFI и TFI на генах.

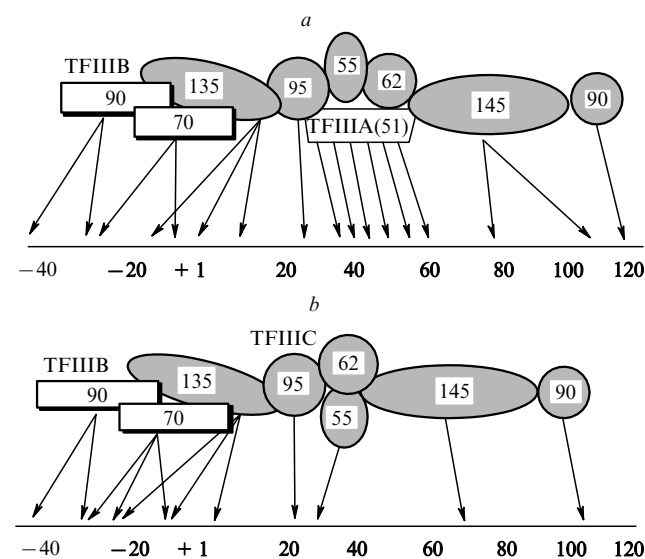


Рис. 5. Схема взаимодействия транскрипционных факторов III с генами 5S рРНК (а) и 4-й супрессорной тРНК^{Tyr} (б). Для TFI, TFI и TFI указана масса в кДа. Стрелками указаны положения в последовательности ДНК, подвергшиеся фотосшивке с той или иной субъединицей факторов транскрипции.

Для факторов ТФП с помощью фотоаффинной модификации удалось установить детальное расположение субъединиц на двух ДНК, кодирующих соответственно одну из транспортных РНК и рибосомную 5S РНК. Для РНК-полимеразы III характерно расположение части промоторной области в пределах кодирующей части. С использованием генно-инженерной техники была получена большая серия двунитевых ДНК,^{56,57} одна из нитей которых была подвергнута с помощью ДНК-полимеразы элонгации на несколько звеньев с включением в смесь элонгирующих субстратов фотоактивного dNTP — 5-(3-л-азидобензоиламиноаллил)dUTP. Таким способом фотоактивная метка вводилась в разные положения ДНК, после чего формировался комплекс с соответствующими факторами, проводилась фотоаффинная модификация факторов и устанавливалось, с какими генами произошло ковалентное связывание.

Х. Заключение

Методы, основанные на химической модификации, начали применять к системам матричного биосинтеза прежде всего на рибосомах. Первые работы по модификации области связывания тРНК с помощью алкилирующего производного тРНК и области связывания мРНК с помощью алкилирующего производного олигонуклеотида были опубликованы в начале 70-х годов.^{58,59} За ними последовали систематические исследования структурно-функциональной топографии рибосом *E.coli* с помощью фотоактивных производных тРНК и реакционноспособных производных рибоолигонуклеотидов (основные результаты этих исследований представлены в обзоре⁶⁰). В последние годы аналогичные исследования начаты на рибосомах из плаценты человека. Получена информация о белковом окружении и участках рибосомной РНК в области, в которой происходит декодирование генетической информации.^{61,62} Для установления пространственной организации рибосом широкое применение нашли методы бифункциональных сшивок, позволяющие определять взаимное расположение рибосомных белков и их расположение относительно определенных участков рибосомных РНК. Это позволило в сочетании с данными по взаимному расположению белков, найденному методом рассеяния нейтронов, построить детальную трехмерную модель расположения 16S рибосомной РНК в малой субъединице рибосомы *E.coli*.⁶³

Из данных, приведенных в обзоре, видно, что систематическое применение химических методов к изучению транскрипции только начинается.

За исключением исследования рибосом метод бифункциональных сшивок не нашел пока широкого применения при изучении транскрипции. В качестве отдельного примера можно упомянуть работу⁶⁴, которой авторы использовали бифункциональный реагент — *N*-гидроксисукцинимидил-4-азидобензоат для выяснения взаимодействия субъединиц РНК-полимеразы из *E.coli* с белком ω , присутствующим в высокоочищенном препарате фермента в стехиометрическом количестве, но не являющимся необходимым компонентом транскрипции. Данные бифункциональной сшивки показали, что белок связан с β' -субъединицей полного фермента. Метод бифункциональных сшивок особенно эффективен для изучения систем с большим числом белков и нуклеиновых кислот, и поэтому можно ожидать, что его значение будет возрастать по мере перехода к изучению транскрипции в более сложных системах, например, в комплексах хромосомной ДНК с эукариотическими РНК-полимеразами и набором факторов транскрипции, в том числе и в составе хроматина.

Из приведенных примеров видно, что химические подходы открывают новые уникальные возможности в изучении матричного биосинтеза. Наиболее впечатляющими в настоящее время представляются возможности исследования механизма поиска ферментом точек, в которых начинается

функционально значимый процесс,²⁰ определение положения и размеров расплетенного участка ДНК на РНК-полимеразе и его перемещение по ходу транскрипции,²⁶ определение коридора выхода РНК, т.е. фактически «следа» перемещения образовавшегося продукта на ферменте по мере его удаления от каталитического центра, в котором происходит биосинтез.^{29–34} Сейчас трудно даже мысленно представить себе эксперименты, не основанные на химических подходах, позволяющие столь глубоко заглянуть в динамические аспекты матричного биосинтеза. При этом некоторые из описанных приемов могут и уже начали применяться для изучения процесса транскрипции в клеточных органеллах.^{35,36}

Литература

1. D.G.Knorre, V.V.Vlassov. *Affinity Modification of Biopolymers*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989
2. Д.Г.Кнорре, С.Д.Мызина. В кн. *Биологическая химия*. Высшая школа, Москва, 1992. С. 199
3. Д.Г.Кнорре, С.Д.Мызина. В кн. *Биологическая химия*. Высшая школа, Москва, 1992. С. 232
4. B.Lebank, T.Moss. In *DNA-Protein Interactions, Principles and Protocols*. (Ed. G.G.Kneale). Humana Press, Totowa, New York, 1994. P. 1
5. M.A.Price, T.D.Tulius. *Eur. J. Biochem.*, **212**, 194 (1992)
6. W.C.Suh, W.Ross, M.T.Record. *Science*, **259**, 358 (1993)
7. R.Hori, S.Pyo, M.Carey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6047 (1995)
8. M.A.Grachev, T.I.Kolochova, E.A.Lukhtanov, A.A.Mustaev. *Eur. J. Biochem.*, **163**, 113 (1987)
9. V.N.Ankilovala, D.G.Knorre, V.V.Kravchenko, O.I.Lavrik, G.A.Nevinski. *FEBS Lett.*, **60**, 172 (1975)
10. M.M.Hanna, Y.Zhang, J.C.Reidling, M.J.Thomas, J.Jou. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2073 (1993)
11. K.C.Smith. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 354 (1969)
12. Н.П.Скиба, В.А.Ефимов, В.М.Липкин, О.Г.Чахмаева, Ю.А.Овчинников. *Биоорг. химия*, **12**, 1023 (1986)
13. B.Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, J.D.Watson. In *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publ. Inc., New York, 1994. P. 365
14. D.T.Yager, P.H.Hippel. *Biochemistry*, **30**, 1097 (1991)
15. Z.Hillel, C.-W.Wu. *Biochemistry*, **17**, 2954 (1978)
16. R.B.Simpson. *Cell*, **18**, 277 (1979)
17. K.L.Brodolin, V.M.Studitsky, A.D.Mirzabekov. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5748 (1993)
18. A.Chenick, R.Bealashvili, A.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **128**, 46 (1981)
19. Л.К.Савинкова, А.А.Соколенко, И.Т.Тулоханов, В.Л.Кнорре, Р.И.Салганик, А.Г.Веньямина, М.Н.Репкова, Н.И.Комарова. *Молекуляр. биология*, **27**, 64 (1993)
20. C.S.Park, F.Y.-H.Wu, C.-W.Wu. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6950 (1982)
21. P.Schickor, W.Metzger, W.Werel, H.Lederer, H.Heumann. *EMBO J.*, **9**, 2215 (1990)
22. W.Metzger, P.Schickor, H.Heumann. *EMBO J.*, **8**, 2745 (1989)
23. A.Spasky. *J. Mol. Biol.*, **188**, 99 (1986)
24. A.Spasky. *Biochemistry*, **31**, 10502 (1992)
25. E.Nudler, A.Goldfarb, M.Kashlev. *Science*, **265**, 793 (1994)
26. E.Zaychikov, L.Denisova, H.Heumann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1739 (1995)
27. G.A.Rice, M.J.Chamberlin, C.M.Kane. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 113 (1993)
28. Е.Д.Свердлов, С.А.Царев, Н.Н.Модянов, В.М.Липкин, М.А.Грачев, Е.Ф.Зайчиков, А.Г.Плетнев. *Биоорг. химия*, **4**, 1278 (1978)
29. М.А.Грачев, Е.Ф.Зайчиков. *FEBS Lett.*, **130**, 23 (1981)
30. J.M.Zengel, L.Lindahl. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2429 (1993)
31. T.M.Stackhouse, C.F.Meares. *Biochemistry*, **27**, 3038 (1988)
32. И.Г.Царев, А.А.Мустаев, Е.Ф.Зайчиков, Т.Ю.Аликина, А.Г.Веньямина, М.Н.Репкова. *Биоорг. химия*, **16**, 765 (1990)
33. T.S.Godovikova, M.A.Grachev, I.V.Kutyavin, I.G.Tsarev, V.F.Zarytova, E.F.Zaychikov. *Eur. J. Biochem.*, **166**, 611 (1987)

34. B. Bartholomew, M.E.Dahmus, C.F.Meares. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14226 (1986)
35. M.Roberge, E.M.Bradbury. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18553 (1988)
36. M.Roberge, M.E.Dahmus, E.M.Bradbury. *J. Mol. Biol.*, **201**, 545 (1988)
37. A.R.Schaffner, E.D.Jorgensen, W.T.McAllister, G.R.Hartmann. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8773 (1987)
38. M.Riva, A.R.Schaffner, A.Sentenac, G.R.Hartmann, A.A.Mustaev, E.F.Zaychikov, M.A.Grachev. *J. Biol. Chem.*, **262**, 14377 (1987)
39. Т.Г.Максимова, А.А.Мустаев, Е.Ф.Зайчиков, А.В.Полухин, В.К.Райт. *Биорг. химия*, **16**, 1145 (1990)
40. M.A.Grachev, G.R.Hartmann, T.G.Maximova, A.A.Mustaev, A.R.Schaffner, H.Sieber, E.F.Zaychikov. *FEBS Lett.*, **200**, 287 (1986)
41. T.G.Maksimova, A.A.Mustayev, E.F.Zaychikov, D.L.Lyakhov, V.L.Tunitskaya, A.Kh.Akbarov, S.V.Luchin, V.O.Rechinsky, B.K.Chernov, S.N.Kochetkov. *Eur. J. Biochem.*, **195**, 841 (1991)
42. A.Mustaev, M.Kashlev, J.Lee, A.Polyakov, A.Lebedev, K.Zalenskaya, M.Grachev, A.Goldfarb, V.Nikiforov. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23927 (1991)
43. I.Treich, C.Carles, A.Sentenac, M.Riva. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4721 (1992)
44. O.V.Morozova, N.A.Belyavskaya, E.F.Zaychikov, E.A.Kvetkova, A.A.Mustaev, A.G.Pletnev. *Biomed. Sci.*, **2**, 183 (1991)
45. A-Y.M.Woody, R.K.Evans, R.W.Woody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 917 (1988)
46. A-Y.M.Woody, C.R.Vader, R.W.Woody, B.E.Haley. *Biochemistry*, **23**, 2843 (1984)
47. S.Borukhov, J.Lee, A.Goldfarb. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23932 (1991)
48. M.M.Hanna, Y.Zhang, J.C.Reidling, M.J.Thomas, J.Jou. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2073 (1993)
49. E.Freund, P.M.McGuire. *Biochemistry*, **25**, 276 (1986)
50. V.Markovtsov, A.Mustaev, A.Goldfarb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3221 (1996)
51. E.Zaychikov, E.Martin, L.Denissova, M.Kozlov, V.Markovtsov, M.Kashlev, H.Heumann, V.Nikiforov, A.Goldfarb, A.Mustaev. *Science*, **273**, 107 (1996)
52. A.Mustaev, E.Zaychikov, K.Severinov, M.Kashlev, A.Polyakov, V.Nikiforov, A.Goldfarb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12036 (1994)
53. I.Kang, J.Lin, J.H.Wang. *Biochemistry*, **33**, 2696 (1994)
54. S.Kelly, N.Sheng, D.Dennis. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7787 (1990)
55. N.Sheng, E.B.Mougey, S.Kelly, D.Dennis. *Biochemistry*, **32**, 2248 (1993)
56. B.Bartholomew, G.A.Kassavetis, B.R.Braun, E.P.Geiduschek. *EMBO J.*, **9**, 2197 (1990)
57. B.R.Braun, B.Bartholomew, G.A.Kassavetis, E.P.Geiduschek. *J. Mol. Biol.*, **228**, 1063 (1992)
58. E.S.Bochkareva, V.G.Budker, A.S.Girshovich, D.G.Knorre, N.M.Teplova. *FEBS Lett.*, **19**, 121 (1971)
59. В.Г.Будкер, А.С.Гиршович, Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова, Д.Г.Кнорре, Н.Д.Кобец. *Докл. АН СССР*, **211**, 725 (1973)
60. Г.Г.Карпова, Д.Г.Кнорре. *Успехи биол. химии*, **32**, 3 (1991)
61. K.N.Bulygin, N.B.Matasova, D.M.Graifer, A.G.Veniaminova, V.I.Yamkovoy, J.Stahl, G.G.Karpova. *Biochim. Biophys. Acta*, (1997)
62. A.A.Malygin, D.M.Graifer, K.N.Bulygin, M.A.Zenkova, V.I.Yamkovoy, J.Stahl, G.G.Karpova. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 715 (1994)
63. R.Brimacombe, J.Atmadja, W.Stiege, D.Schuler. *J. Mol. Biol.*, **199**, 115 (1988)
64. D.R.Gentry, R.R.Burgess. *Biochemistry*, **32**, 11224 (1993)

CHEMICAL APPROACHES FOR STUDYING OF TEMPLATE BIOSYNTHESIS: GENERAL QUESTIONS AND INVESTIGATION OF TRANSCRIPTION

D.G.Knorre, N.V.Kudryashova, O.I.Lavrik

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
8, Prosp. Akad. Lavrent'eva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383-2)35-1665*

The chemical approaches for studying of systems of template biosynthesis are considered. The problems of template biosynthesis which may be solved by the use of these approaches and general results relating to the transcription are described. Of special interest is the study of interactions of RNA polymerase and her subunits with DNA and RNA — product. The application of the method of affinity modification for investigation of active centers of RNA polymerases and of interactions of transcription factors with DNA is described.

Bibliography — 64 references.

Received 17th January 1997