

ПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ ТОПОИЗОМЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ, ОБНАРУЖЕННАЯ У НОВОЙ ЭКСТРЕМАЛЬНО ТЕРМОФИЛЬНОЙ АНАЭРОБНОЙ АРХЕБАКТЕРИИ, ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ СЕРУ *

А. И. Слесарев

Введение. Топологическое состояние ДНК играет важную роль в функционировании ее в клетке. У эукариот суперспирализация ДНК является необходимым этапом в формировании ДНК-гистоновых комплексов, и тем самым она вовлечена в организацию хромосом [1]. У прокариот суперспирализованное состояние ДНК сопряжено с торсионным напряжением, важным для процессов репликации, транскрипции, генетической рекомбинации [2].

Топоизомеразы являются ферментами, контролирующими сверхспиральное состояние ДНК в клетке. У бактерий такой контроль осуществляется «антагонистическим» действием ферментов двух типов: топоизомеразы I (ω -белок), которая релаксирует отрицательно суперспирализованную ДНК [3], и топоизомеразы II (ДНК-гиразы), вводящей отрицательные супервитки в релаксированную кольцевую замкнутую (кз) ДНК [4—6]. У эукариот функции топоизомераз до конца не выяснены: хотя у них и присутствуют топоизомеразы типов I и II, отрицательной топоизомеразной активности пока не обнаружено.

До недавнего времени все работы, где исследовали влияние топологического состояния ДНК на фундаментальные клеточные процессы, свидетельствовали в пользу отрицательной сверхспирализации ДНК в клетках прокариот [2, 5, 7] и эукариот [8—10]. Обнаружение топоизомеразы в клетках *Sulfolobus acidocaldarius*, названной «обратной гиразой» и способной создавать положительные супервитки как в релаксированной, так и в отрицательно суперспирализованной кз ДНК, заставило пересмотреть это представление [11—13]. Наконец, Надал и др. [14] прямо показали, что ДНК существует в положительном суперспиральном состоянии в геноме вирусоподобной частицы SSV-1, присутствующей в клетках *Sulfolobus*. Организм, на котором были выполнены эти работы, является экстремальной термоацидофильной архебактерией, т. е. относится к обособившейся филогенетической ветви организмов, существенно отличающейся как от эубактерий, так и от эукариот [15, 16].

В настоящей работе сообщается об обнаружении и некоторых свойствах обратной гиразы из клеток *Desulfurococcus amylolyticus*.

Материалы и методы. *D. amylolyticus* — новая экстремально термофильная анаэробная сероредуцирующая архебактерия [17]. Она выделена из горячих источников Камчатки, растет в интервале температур от 68 до 97 °С, с оптимумом при 92 °С и рН 6,4. Клетки выращивали во флаконах объемом 0,5 л из-под культуральных сред фирмы «Gibco» при температуре 92 °С в течение 20 ч в среде, содержащей 0,2 % дрожжевого экстракта («Difco», США), 2 г/л пептона («Difco», США), 0,33 г/л NH_4Cl , 0,33 г/л $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,33 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,33 г/л KH_2PO_4 , 1,5 г/л NaHCO_3 , 2 мл/л микроэлементов Липперта [18]. Анаэробные условия создавали по методу Хангейта [19]. В качестве восстанавливающего агента использовали Na_2S в концентрации 0,5 г/л. Около 3 г биомассы, полученной из 10 л культуральной среды, суспендировали в 20 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,6 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10 % глицерина, 1 мМ ФМСФ, 1 мкг/мл лейпептина («Serva», ФРГ), 10 мМ 2-меркаптоэтанол («Fegak», ФРГ). Клетки разрушали ультразвуком. Лизат центрифугировали в течение 2 ч при 40000 об/мин в ультрацентрифуге Ж-62 (СССР). К надосадочной жидкости по каплям добавляли 20 %-ный полимин П (рН 7,5) до концентрации 0,3 % при непрерывном перемешивании в ледяной бане. Преципитат удаляли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 1 ч. Далее к супернатанту добавляли сульфат аммония

* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким

(65 % от насыщения), центрифугировали и осадок растворяли в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 % глицерина, 1 мМ спермидин («Serva», ФРГ), 1 мМ ФМСФ, 1 мМ лейпептин, 10 мМ 2-меркаптоэтанол (буфер А), и диализовали против этого же буфера. Полученную фракцию наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой («Pharmacia», Швеция) объемом 20 мл, уравновешенную буфером А, и элюировали линейным градиентом концентрации NaCl: 0,01—0,5 М.

Стандартная реакционная система (объем 20 мкл) для исследования топоизомеразной активности содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl,

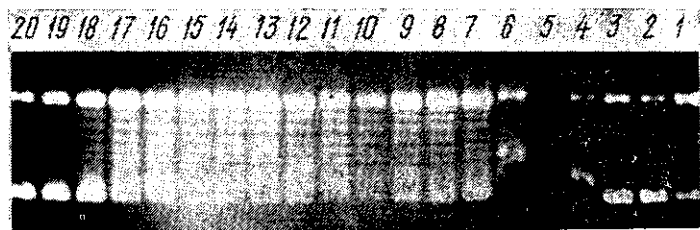


Рис. 1. Топоизомеразная активность фракций, полученных хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе: 1-я дорожка справа — контрольная ДНК *pBR322*; остальные дорожки показывают активность каждой фракции

Fig. 1. Fractionation of topoisomerase activities on DEAE-cellulose. Right lane: DNA *pBR322* control, other lanes show the activity in each fraction of the column (from right to left)

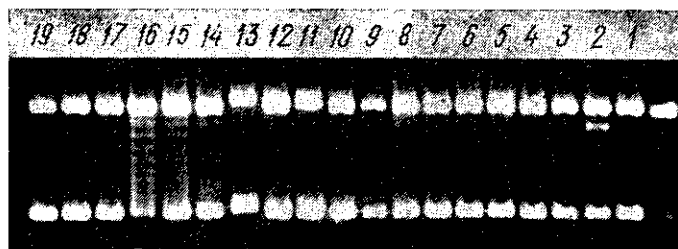


Рис. 2. Топоизомеразная активность фракций, полученных хроматографией фракции II на фосфоцеллюлозе: 1-я дорожка справа — контрольная ДНК *pBR322*; остальные дорожки показывают активность каждой фракции

Fig. 2. Fraction II phosphocellulose column chromatography. Right lane: DNA *pBR322* control; other lanes show the activity in each fraction of the column (from right to left)

1 мМ дитиотреитол («Serva», ФРГ), 1 мМ АТФ («Sigma», США), 15 мкг/мл отрицательно суперспирализованной ДНК плазмиды *pBR322*. По 2 мкл каждой фракции, вышедшей после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, инкубировали в системе при 80 °С в течение 30 мин. Реакцию прекращали, быстро охлаждая смесь до комнатной температуры и добавляя 1/5 объема 5 %-ного DS-Na, 50 мМ ЭДТА, 50 %-ного глицерина, 0,5 %-ного бромфенолового синего. Продукты топоизомеризации анализировали электрофорезом в 1 %-ной агарозе в буфере, содержащем 40 мМ трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0.

Фракции 10—18, вышедшие после ДЭАЭ-хроматографии (рис. 1), объединили и приготовили сульфатную фракцию 1, 65 % от насыщения. Осадок фракции 1 растворили в 20 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,1 М NaCl, 1 мМ спермидин, 1 мМ ФМСФ, 1 мкг/мл лейпептина, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 20 % глицерина (буфер Б), и диализовали против этого же буфера. Препарат наносили на колонку объемом 8 мл с фосфоцеллюлозой Р-11 («Whatman», Англия), уравновешенную буфером Б, промывали двумя объемами того же буфера и элюировали 60 мл линейного градиента концентрации NaCl: 0,1—0,8 М. Активные фракции (рис. 2) объединяли и диализовали против буфера В: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 50 %-ный глицерин, 1 мМ спермидин, 1 мМ дитиотреитол, 0,5 М NaCl. Дальнейшую работу вели с этим препаратом.

Белковый состав фракций, получающихся в ходе очистки, анализировали в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na согласно рекомендациям фирмы «LKB» (Швеция), используя систему для горизонтального электрофореза «Multiphor».

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [20], применяя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Для анализа топоизомеров, образующихся в результате инкубации плазмиды *pBR322* с фосфоцеллюлозной фракцией топоизомеразы, использовали метод двухмерного электрофореза в 1 %-й агарозе [21]. Вначале электрофорез проводили в одном направлении в течение 14—16 ч при напряженности электрического поля 1,5—2 В/см, затем гель инкубировали 4 ч в электродном буфере в присутствии 2 мкг/мл хлорохина и вели электрофорез в ортогональном направлении в течение 8—10 ч при той же напряженности электрического поля. Во втором направлении подвижность положительных топоизомеров увеличивается из-за повышения суперспиральной плотности при связывании с хлорохином, а подвижность отрицательных топоизомеров уменьшается, так как хлорохин релаксирует отрицательно суперспирализованную ДНК.

Результаты и обсуждение. Для обнаружения топоизомеразной активности в качестве субстрата использовали отрицательно суперспирализованную ДНК *pBR322*. В неочищенном экстракте интересующая активность не обнаруживалась (по-видимому, из-за присутствия нуклеаз), но после хроматографии сульфатной фракции на ДЭАЭ-целлюлозе выявлена релаксирующая активность в составе двух

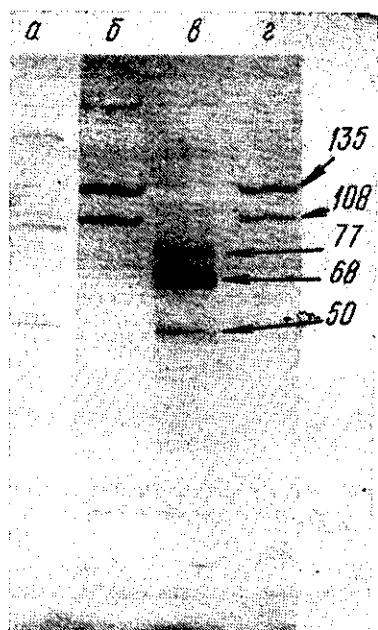


Рис. 3. Белковый состав ДЭАЭ-целлюлозной (а, 1 мкг фракции II) и фосфоцеллюлозной (б, 1 мкг) фракций, полученных с помощью электрофореза в градиенте пористости ПААГ ($T=4-22,5\%$) в присутствии DS-Na. В качестве маркеров молекулярной массы (указана $\cdot 10^{-3}$) использовали трансферрин, человеческий альбумин и тяжелую цепь человеческого гамма-глобулина (в), а также РНК-полимеразу *Thermoplasma acidophilum* (г)

Fig. 3. Proteins in the DEAE-cellulose fraction (a, 1 μg of fraction II) and in phosphocellulose fraction (b, 1 μg) of the topoisomerase. SDS-electrophoresis performed in pore gradient of polyacrylamide ($T=4-22.5\%$). Transferrin, albumin (human), γ -globulin H-chain (human) (c) and *Thermoplasma acidophilum* RNA-polymerase (d) were used as molecular weight standards

пиков: 1 — фракции 6—9; 2 — фракции 10—18 (рис. 1). Фракции второго пика далее хроматографировали на фосфоцеллюлозе. Наличие релаксирующей активности показано в интервале 0,6—0,7 М NaCl (фракции 13—15, рис. 2).

На рис. 3 приведена электрофореграмма фракций топоизомеразы на разных стадиях очистки. Как видно из рисунка, фосфоцеллюлозная фракция содержит два полипептида с молекулярными массами 135000 и 108000. Для сравнения отметим, что обратная гираза, которую выделили из клеток *S. acidocaldarius*, является полипептидом с молекулярной массой 132000 [12]. Пока нельзя сказать, какой из двух белков является ответственным за положительную топоизомеразную активность. Возможно, эффект обусловлен их совместным действием.

На рис. 4 показаны результаты анализа методом двухмерного электрофореза ДНК плазмиды *pBR322*, инкубированной с разными количествами фосфоцеллюлозной фракции топоизомеразы. На рис. 4, в, видно, что наряду с набором отрицательных топоизомеров, получающихся в результате релаксации неразрешаемых в 1 %-ной агарозе топоизомеров с высокой отрицательной суперспиральной плотностью, присутствует и ветвь положительных топоизомеров. Молярное отношение фермента к субстрату в этом случае не превышает 0,1. При большей

концентрации фермента (молярное отношение=6—7) вся ДНК оказывается положительно суперспирализована (рис. 4, *г*).

Следует отметить, что температура инкубации была 80 °С, а электрофорез проводили при 20 °С. Суперспиральная плотность ДНК, как

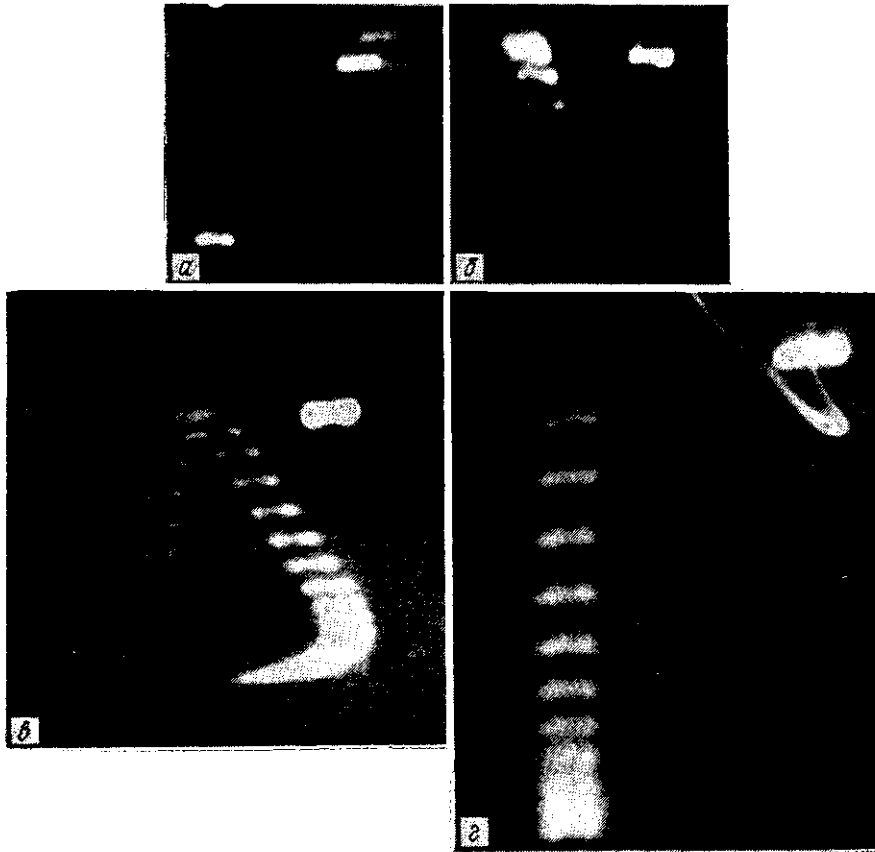


Рис. 4. Двухмерный электрофорез в 1 %-ной агарозе (разделение в первом направлении вела сверху вниз, во втором — справа налево): *а* — контрольная ДНК *pBR322* (0,3 мкг); видимые полосы: отрицательно суперспирализованная ДНК (нижняя полоса), открытая кольцевая ДНК (средняя полоса), отрицательно суперспирализованная димерная ДНК (верхняя полоса); *б* — релаксированная ДНК *pBR322*; видна ветвь отрицательно суперспирализованных топозомеров; *в* — ДНК *pBR322* (0,3 мкг), инкубированная с 1,5 нг фосфоцеллюлозной фракции *Desulfurococcus* топозомеразы; видны ветви отрицательных и положительных топозомеров; *г* — ДНК *pBR322* (0,3 мкг), инкубированная с 0,1 мкг фосфоцеллюлозной фракции *Desulfurococcus* топозомеразы; присутствуют только положительные топозомеры

Fig. 4. Two-dimensional electrophoresis in a 1 % agarose gel. Separation in the first dimension was from top to bottom; in the second — from right to left: *a* — DNA *pBR322* (0.3 μ g) control; three visible bands are, respectively, negative supercoiled DNA (lower band), open circular DNA (middle band), negative supercoiled dimer DNA (upper band); *б* — relaxed DNA *pBR322*; visible branch is negative supercoiled topoisomers; *в* — DNA *pBR322* (0.3 μ g) after incubation with 1.5 ng of phosphocellulose fraction of *Desulfurococcus* topoisomerase; the left part of arch contains positive supercoiled topoisomers, the right part of arch contains negative supercoiled topoisomers; *г* — DNA *pBR322* (0.3 μ g) after incubation with 0.1 μ g of phosphocellulose fraction of *Desulfurococcus* topoisomerase; there are only positively supercoiled topoisomers

известно, зависит от температуры [22], и на *pBR322* при уменьшении температуры на 60 °С сбрасывается примерно девять положительных супервитков (эта оценка получена экстраполяцией зависимости угла вращения спирали от температуры на область высоких температур; Ли и Бауэр [23] показали, что это справедливо, по меньшей мере, вплоть до 65 °С). Поэтому в реакционных условиях ДНК более положительно суперспирализована, чем в условиях электрофореза и, например, еще

разрешаемый 9-й положительный топоизомер (в первом направлении) при 80 °С был 18-м.

Выше уже указывалось, что реакцию проводили обычно при 80 °С, хотя оптимальной температурой роста *D. amylolyticus* является 92 °С. Это объясняется тем, что при температуре ниже 65 °С активности не наблюдалось, а при 90 °С в ДНК образовывались открытые кольца в заметных количествах.

На рис. 5 и 6 представлены зависимости топоизомеразной активности от концентрации АТФ, Mg²⁺, Na⁺. Как видно из приведенных

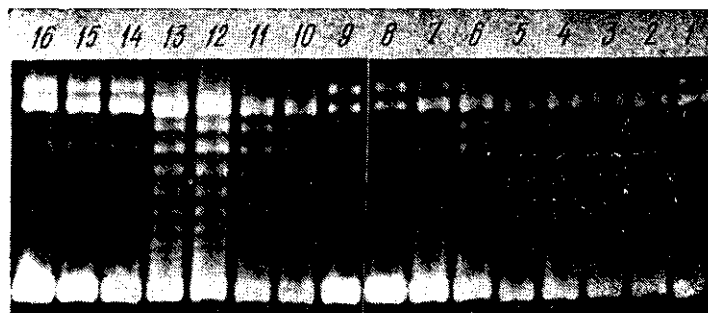


Рис. 5. Зависимость топоизомеразной активности от концентрации АТФ и Mg²⁺: 1 — контрольная ДНК *pBR322*; 2—8 — концентрация АТФ 10; 1; 0,5; 0,1; 0,01; 0,001; 0 мМ соответственно; 9—16 — концентрация MgCl₂ 50; 20; 10; 5; 1; 0,2; 0,04; 0 мМ соответственно. Реакционная смесь содержала 0,3 мкг ДНК и 1,5 нг фермента

Fig. 5. Effects of ATP and Mg²⁺ on the topoisomerase activity: 1 — DNA *pBR322* control; 2-8 — ATP concentration: 10.0; 1.0; 0.5; 0.1; 0.01; 0.001; 0.0 mM, respectively; 9-16 — MgCl₂ concentration: 50.0; 20.0; 10.0; 5.0; 1.0; 0.2; 0.04; 0.0 mM, respectively. 0.3 μg of DNA was incubated with 1.5 ng of enzyme in the standard assay mixture

данных (рис. 5), реакция является АТФ-зависимой, и минимальной концентрацией АТФ, при которой еще наблюдается активность, является 1 мкМ. В отсутствие ионов Mg²⁺ и Na⁺ реакция не идет, равно

как и при их высокой концентрации (рис. 5, 6). В качестве оптимальных концентраций выбрали следующие: АТФ — 0,5—1,0 мМ; Mg²⁺ — 5—10 мМ; Na⁺ — 200—300 мМ.

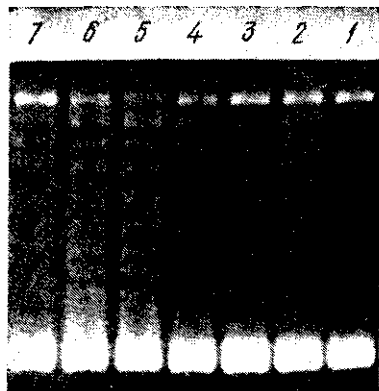


Рис. 6. Зависимость топоизомеразной активности от концентрации Na⁺: 1 — контрольная ДНК *pBR322*; 2—7 — концентрация NaCl 50; 100; 125; 175; 250; 380 мМ соответственно. Реакционная смесь содержала 0,3 мкг ДНК и 1,5 нг фермента

Fig. 6. Effect of Na⁺ on the topoisomerase activity: 1 — DNA *pBR322* control; 2-7 — NaCl concentration: 50; 100; 125; 175; 250; 380 mM, respectively, 0.3 μg of DNA was incubated with 1.5 ng of enzyme in the standard assay mixture

В описанных выше экспериментах в качестве субстрата использовали отрицательно суперспирализованную ДНК *pBR322*. Интересно было проверить, проявляет ли фермент истинную положительную топоизомеразную активность, т. е. действует ли он на релаксированную и незначительно положительно сверхспирализованную ДНК. На рис. 7 приведен результат такой проверки. ДНК релаксировали топоизомеразой I из ростков пшеницы («Serva», ФРГ) в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7,9, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 20%-ный глицерин. В результате получился набор из четырех отрицательно суперспирализованных топоизомеров (рис. 7, б). После инкубации этого препарата с фосфоцеллюлозной фракцией обратной гиразы

отрицательные топоизомеры исчезают и появляются четыре положительных топоизомера (рис. 7, а). Следует подчеркнуть, что в условиях инкубации фермент действует на уже изначально положительно суперспирализованный субстрат (как уже отмечалось выше, при переходе от комнатной температуры к температуре инкубации в ДНК *pBR322* появляются примерно 9 дополнительных топоизомеров и наоборот).

В этих опытах молярное отношение фермента к субстрату равнялось 5—7. Дополнительные положительные топоизомеры (по сравнению с контролем) не появлялись, если это отношение было меньше 0,1

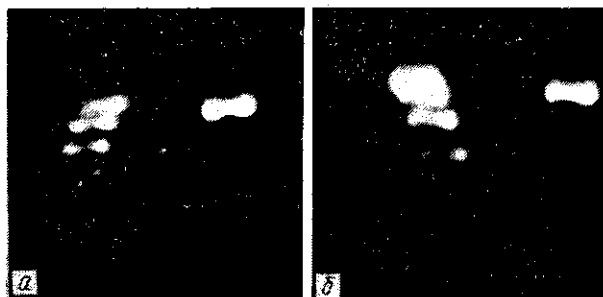


Рис. 7. Действие фермента на релаксированную ДНК *pBR322*: а — релаксированная ДНК (0,3 мкг); б — ДНК после инкубации с 0,1 мкг фермента

Fig. 7. Enzyme action on the relaxed DNA *pBR322*: а — relaxed DNA (0.3 µg); б — DNA after incubation with 0.1 µg of enzyme

(результаты не приведены), хотя для проявления активности на отрицательно суперспирализованном субстрате такого количества фермента было достаточно. Различие в действии фермента на отрицательно суперспирализованный и релаксированный субстраты можно было бы объяснить, предположив, что по мере увеличения положительной суперспиральной плотности ДНК способность фермента связываться с ней падает. На это указывают и авторы работы [11].

Следует отметить еще одно свойство нашего препарата. Организм, из которого его получили, является строгим анаэробом, и можно было ожидать, что в присутствии O_2 активности не будет наблюдаться, как это имеет место в случае с РНК-полимеразой из *D. mucosus* [24]. Однако этого не произошло. Все стадии выделения проходили в обычных условиях, и препарат сохранял активность на протяжении нескольких месяцев в аэробной атмосфере.

На сегодняшний день положительная топоизомеразная активность обнаружена в клетках *Sulfolobus* и в клетках миеломы S107 [25]. Эти данные вместе с результатами, изложенными в работе, позволяют предположить, что явление положительной суперспирализации не носит единичного характера и, возможно, является альтернативным механизмом регуляции и экспрессии генов [13, 14]. В литературе по этому вопросу обсуждается также и возможная роль положительной суперспирализации в стабилизации ДНК в высокотемпературных условиях (для *Sulfolobus* — это $80^\circ C$). В нашем случае последняя возможность особенно привлекательна, так как *D. amylolyticus* растет вплоть до $97^\circ C$.

Автор глубоко признателен С. А. Козьявкину за полезные обсуждения при написании статьи, К. А. Серовой и В. М. Конькову — за внимание к работе и практическую помощь при подготовке статьи к публикации.

POSITIVE TOPOISOMERASE ACTIVITY REVEALED IN A NEW EXTREME-THERMOPHILIC ANAEROBIC ARCHAEABACTERIUM, REDUCING SULFUR

A. I. Slesarev

Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Topoisomerase able to introduce positive supercoils into a closed circular DNA has been first found and partially purified from anaerobic archaeobacterium. The topoisomerase fraction obtained by chromatography on phosphocellulose contains two polypeptides with molecular weights 108000 and 135000. ATP, ions Na⁺ and Mg²⁺ are needed for the enzyme functioning. *Desulfurococcus* topoisomerase is not inhibited by O₂.

1. Gellert M. DNA topoisomerases // Ann. Rev. Biochem.—1983.—50.—P. 879—910.
2. Грагеров А. И., Миркин С. М. Влияние сверхспирализации ДНК на основные генетические процессы у прокариот // Молекуляр. биология.—1970.—14, № 1.—С. 8—34.
3. Wang J. C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω // J. Mol. Biol.—1971.—55, N 3.—P. 523—533.
4. DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA / M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, H. A. Nash // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1976.—73, N 11.—P. 3872—3876.
5. Pruss G. J., Manes S. H., Drlica K. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes // Cell.—1982.—31, N 1.—P. 35—42.
6. Menzel R., Gellert M. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling // Ibid.—1983.—34, N 1.—P. 105—113.
7. DiNardo S., Voelkel A. K., Sternglanz R. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes // Ibid.—1982.—31, N 1.—P. 43—51.
8. Harland R. M., Weintraub H., McKnight S. L. Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology // Nature.—1983.—302, N 5903.—P. 38—43.
9. Ryoji M., Worcel A. Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes *in vivo* studies // Cell.—1984.—37, N 1.—P. 21—32.
10. Glikin G. C., Ruberti I., Worcel A. Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: *In vitro* studies // Ibid. P. 33—41.
11. Kikuchi A., Asai K. Reverse gyrase—a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA // Nature.—1984.—309, N 5970.—P. 677—681.
12. High positive supercoiling *in vitro* catalyzed by an ATP and polyethylene glycol-stimulated topoisomerase from *Sulfolobus acidocaldarius* / P. Forterre, G. Mirambeau, K. Jaxel et al. // The EMBO J.—1985.—4, N 8.—P. 2123—2128.
13. Nakasu S., Kikuchi A. Reverse gyrase; ATP-dependent type I topoisomerase from *Sulfolobus* // Ibid.—N 10.—P. 2705—2710.
14. Positive supercoiled DNA in a virus-like particle of an archaeobacterium / M. Nadal, G. Mirambeau, P. Forterre et al. // Nature.—1986.—321, N 6067.—P. 256—258.
15. Woese C. R., Fox G. E. Phylogenetic structure of the procaryotic domain: The primary kingdoms // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 11.—P. 5088—5090.
16. Прангивилли Д. А. Молекулярная биология археобактерий // Молекуляр. биология.—1983.—17, № 2.—С. 234—248.
17. *Desulfurococcus amylolyticus* новый вид экстремально-термофильной археобактерии из гидротерм / Е. А. Бонч-Осмоловская, А. И. Слесарев, М. А. Мирошниченко, Т. П. Светличная // Докл. АН СССР.—1986.—290, № 5.—С. 1259—1263.
18. Lippert K. D. Über das Vitamin B12 Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien // Arch. Microbiol.—1966.—55, N 4.—S. 245—248.
19. Hungate R. E. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes // Method in microbiology / Eds J. R. Norris, D. W. Ribbons.—New York: Acad. press, 1969.—Vol. 3B.—P. 117—132.
20. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976.—72, N 3.—P. 248—254.
21. Lev C.-H. Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 5.—P. 2838—2842.
22. Depew R., Wang J. Conformational fluctuations of DNA helix // Ibid.—1975.—72, N 11.—P. 4275—4279.
23. Lee F. S., Bauer W. R. Temperature dependence of the gel electrophoretic mobility of superhelical DNA // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 5.—P. 1665—1682.
24. DNA-dependent RNA polymerases of thermophilic archaeobacteria / D. Prangishvilli, W. Zilling, A. Gierl et al. // Eur. J. Biochem.—1982.—122, N 3.—P. 471—477.
25. Lazo P. A. Formation of positive supercoiled DNA by a nuclear factor from myeloma cell // Biochem. J.—1985.—231, N 1.—P. 185—188.

Ин-т молекуляр. генетики АН СССР, Москва

Получено 29.12.86.