



УДК 577.143.7:577.142.855

ПРИРОДА КОВАЛЕНТНОЙ СВЯЗИ РЕЛАКСИРУЮЩЕГО БЕЛКА
И ColE1-ДНК В РЕЛАКСАЦИОННОМ КОМПЛЕКСЕ

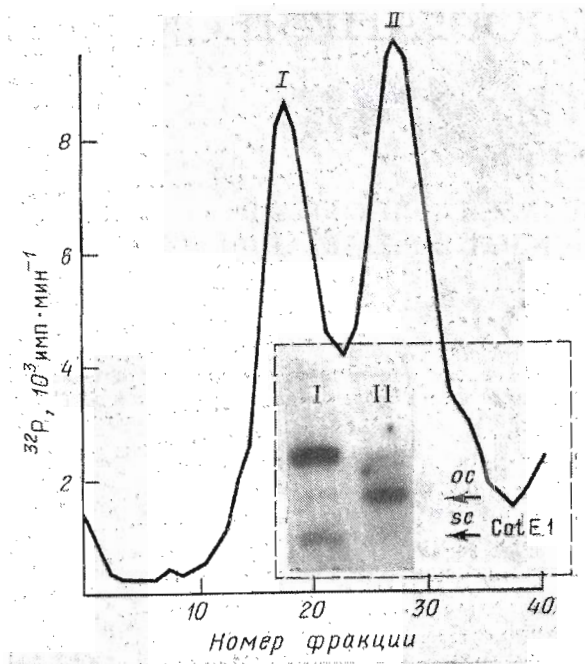
Жуклис Е. Л., Дрыгин Ю. Ф., Богданов А. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского

Переход сверхскрученной формы бактериальной плазмиды в открытую форму (релаксация) в релаксационном комплексе (РК) ColE1-ДНК с белками впервые был показан Хелинским и сотр. (см. обзор [1]). Обработка РК белокденатурирующими агентами приводит к активации специфической эндонуклеазы, которая гидролизует тяжелую цепь ColE1-ДНК в одной точке между dG и dC (нуклеотидные остатки 270, 271 от точки начала вегетативной репликации) и блокирует при этом 5'-фосфатную группу dC, по-видимому, ковалентно связываясь с ней [1-3]. Показано, что релаксация плазмиды предшествует транспорту ее тяжелой нити в клетку-акцептор при конъюгации [1, 4, 5] и инициирует конъюгативную репликацию ColE1-ДНК [1, 4-6].

Явление релаксации известно для многих плазмид и некоторых вирусных ДНК. Релаксации подвержены, кроме того, комплексы сверхскрученных кольцевых ДНК и топоизомераз при обработке их белокденатурирующими агентами [1]. Понимание детального механизма релаксации плазмид и соответственно механизма запуска их репликации предполагает исследование последовательных химических реакций между релаксирующим белком и ДНК и установление структуры продуктов их взаимодействия. Цель настоящего исследования — установление природы ковалентной связи «нуклеотид-аминокислотного узла» в соединении ColE1-ДНК — релаксирующий белок. Препаративное выделение РК связано с большими потерями в силу его исключительно высокой сорбции на поверхностях. Поэтому РК с помощью протеиназ переводили в соединение ДНК-пептид, содержащее интересующую нас структуру. Клетки *E. coli* S600 (ColE1) выращивали на глицеринсодержащей минимальной среде в присутствии [³²P] ортофосфата (100 мкКи/мл). Осветленный лизат *E. coli*, в котором находилась основная масса РК, обрабатывали либо проназой E (Merck, ФРГ) и карбоксипептидазой Y (НПО «Биохимреактив», СССР), либо ТРСЖ-трипсином (Serva, ФРГ). [³²P] ColE1-ДНК-пептид депротеинизировали многократной экстракцией фенолом, обрабатывали РНКазой А (Sigma, США) и выделяли ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы 5--20%. При электрофорезе в 0,8% агарозном геле основная часть [³²P] ДНК, образующая пик II (рисунок), совпадает по подвижности с маркерной открытой кольцевой ColE1-ДНК. Исчерпывающий кислотный гидролиз [³²P] ColE1-ДНК-пептида, последовательно обработанного бактериальной щелочной фосфатазой (Worthington, США) и ДНКазой I (Sigma, США), проводили смесью конц. HCl и F₂CCOOH [7]. Фракционирование продуктов кислотного гидролиза проводили двумерным электрофорезом в тонком слое целлюлозы в условиях полного разделения O-фосфоаминокислот и продуктов гидролиза ДНК [8].

O-Фосфосерин был единственной O-фосфоаминокислотой, обнаруженной этим методом в продуктах кислотного гидролиза. В параллельном эксперименте соединение [³²P] ColE1-ДНК-пептид подвергали исчерпывающему гидролизу панкреатической ДНКазой, нуклеазой PI (Boehringer, ФРГ) и щелочной фосфатазой. Продукты ферментативного гидролиза —



Профиль ультрацентрифугирования $[^{32}\text{P}]\text{ColE1-ДНК}$ — пептида в градиенте концентрации сахарозы 5–20% (5 ч, ротор SW41 Ti, 39 тыс. об./мин, 5° С). Вставка: электрофореграмма в 0,8% агарозе ^{32}P -меченой ДНК, образующей пики I и II. *oc* и *sc* — положение маркерных кольцевой и сверхскрученной форм ДНК соответственно

нуклеотидопептид и неорганический фосфат — разделяли хроматографией на DEAE-сефадексе при pH 8,7 в градиенте концентрации аммоний-форматного буфера (10–300 мМ). Из выделенного $[^{32}\text{P}]$ нуклеотидопептида при гидролизе его фосфодиэстеразой змеиного яда (Worthington, США) отщеплялся единственный нуклеотид — 5'- $[^{32}\text{P}]$ дезоксицитидиловая кислота. Таким образом, нами прямо показано ковалентное соединение остатков серина релаксирующего белка и дезоксицитидиловой кислоты ColE1-ДНК.

Взятые вместе, эти данные позволяют заключить, что «узел связи» ColE1-ДНК и релаксирующего белка имеет структуру дезоксицитидилил-(5'→O)-серин, т. е. релаксирующий белок присоединяется к ДНК фосфодиэфирной связью через гидроксильную группу остатка серина.

Структура нуклеотид-аминокислотного узла в ковалентном соединении ColE1-ДНК — релаксирующий белок тождественна таковой в соединении аденовирусных ДНК (*Ad*-ДНК) и «концевого» белка 55K [9]. Остаток серина участвует также в образовании фосфодиэфирной связи белка р3 и остатка 5'-деоксиадениловой кислоты ДНК фага φ29 *Bacillus subtilis* [10]. Однако *Ad*-ДНК и φ29-ДНК, вирионные или выделенные из зараженных клеток с помощью белокденатурирующих агентов, обнаруживаются в виде линейных молекул. Можно предположить что *Ad*-ДНК и φ29-ДНК могут быть в вирионе или зараженных клетках в кольцевой ковалентно-замкнутой форме, а концевые белки (55K и р3) образовывать с ними специфические комплексы. Обработка таких комплексов белокденатурирующими агентами будет вызывать их релаксацию (по аналогии с действующим топоизомераз II рода). Действительно, недавно [11] в *BRK*- и *HeLa*-клетках, зараженных аденовирусом, была обнаружена кольцевая непрерывная форма *Ad5*-ДНК.

1. Дрыгин Ю. Ф. Итоги науки и техн. Мол. биол. М.: ВИНТИ АН СССР, 1982, т. 17, с. 139-189.
2. Guiney D. G., Helinski D. R. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 22, p. 8796-8803.
3. Selzer G., Som T., Itoh T., Tomizawa J. Cell, 1983, v. 32, № 1, p. 119-129.
4. Dougan G., Sherratt D. Mol. Gen. Genet., 1977, v. 151, № 2, p. 151-160.
5. Warren G. J., Twigg A. J., Sherratt D. J. Nature, 1978, v. 274, № 5663, p. 259-261.
6. Nomura N., Low R. L., Ray D. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 10, p. 3153-3157.
7. Tsugita A., Scheffler J. J. Eur. J. Biochem., 1982, v. 124, № 2, p. 585-588.
8. Manai M., Cozzone A. J. Analyt. Biochem., 1982, v. 124, № 1, p. 12-18.
9. Challberg M. B., Desiderio S. W., Kelly T. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 10, p. 6105-6109.
10. Hermoso J. M., Salas M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 11, p. 6425-6428.
11. Ruben M., Bacchetti S., Graham F. Nature, 1983, v. 301, № 5897, p. 172-174.

Поступило в редакцию
6.XII.1983

ON THE NATURE OF COVALENT LINKAGE BETWEEN RELAXATION PROTEIN AND ColE1 DNA IN THE RELAXATION COMPLEX

ZHUKLYS K. L., DRYGIN Yu. F., BOGDANOV A. A.

A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

O-[³²P]phosphoserine was found to be the only phosphoamino acid in the acid hydrolysate of the [³²P]ColE1 DNA-peptide produced by action of proteases on the ColE1 DNA relaxation complex. This finding suggests that the relaxation protein is bound to ColE1 DNA in the relaxation complex via a phosphodiester linkage between a serine hydroxyl of the protein and the 5'-phosphate of the terminal deoxycytidine residue of the DNA.

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 20.01.84 Подписано к печати 12.03.84 Т-05048 Формат бумаги 70×108¹/₁₆,
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,1 тыс. Уч.-изд. л. 14,5 Бум. л. 4,5
Тираж 865 экз. Зак. 3588

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 10