



УДК 577.152.277*6'13 : 577.112.4

ТОПОГРАФИЯ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА В ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЕ

Селюченко О. А., Чертов О. Ю., Липкин В. М.

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

Проведена химическая модификация ДНК-зависимой РНК-полимеразы радиоактивными моноидом [¹⁴C]уксусной кислотой и N-[¹⁴C]этилмалеимидом. Определено положение экспонированных и функционально важных остатков цистеина в ферменте. Подробно изучена топография остатков цистеина α-субъединицы РНК-полимеразы. Полученные результаты суммированы в виде модели.

Процесс транскрипции генетической информации осуществляется ДНК-зависимой РНК-полимеразой (нуклеозидтрифосфат: РНК-нуклеотидилтрансфераза; КФ 2.7.7.6) [1]. В настоящее время определена первичная структура всех субъединиц фермента [2–5]. Знание первичной структуры является основой для изучения пространственной организации этого белка и механизма его ферментативного действия.

Ранее было показано, что остатки цистеина в РНК-полимеразе играют важную роль в процессах инициации и элонгации, участвуя в расплетании цепей ДНК [6]. Данная работа предпринята с целью выяснения топографии остатков цистеина в ДНК-зависимой РНК-полимеразе *E. coli*, установления местоположения экспонированных и функционально важных остатков цистеина в ферменте.

В предыдущем сообщении [6], что модификация остатков цистеина в интактной РНК-полимеразе иодуксусной кислотой не приводит к снижению активности фермента. Следовательно, при этом модифициру-

Таблица 1

Карбоксиметилирование отдельных субъединиц, кор- и холофермента РНК-полимеразы моноидом [¹⁴C]уксусной кислотой

Субъединица	Общее количество остатков цистеина [2–5]	Количество модифицированных остатков цистеина в 1 моль		
		индивидуальной субъединицы	кор-фермента	холофермента
α	4	1	1	1
β	7	7	2	2
β'	15	10	3	3
σ	3	—	—	1
α ₂ ββ'	30	—	7	—
α ₂ ββ'σ	33	—	—	8

ются доступные для реагента остатки цистеина, не участвующие в функционировании РНК-полимеразы. Для локализации этих остатков цистеина в полипептидных цепях фермента проводилось карбоксиметилирование отдельных субъединиц кор-* и холофермента моноидом [¹⁴C]уксусной кислотой. Препараты кор- и холофермента после карбоксиметилирования разделялись на субъединицы с помощью электрофореза на ацетатцеллюлозе. Количество модифицированных остатков цистеина в каждой субъединице определялось по числу радиоактивных пятен на автордиограммах пеп-

* Кор-фермент (минимальный фермент) образуется в результате отделения α-субъединицы от холофермента РНК-полимеразы.

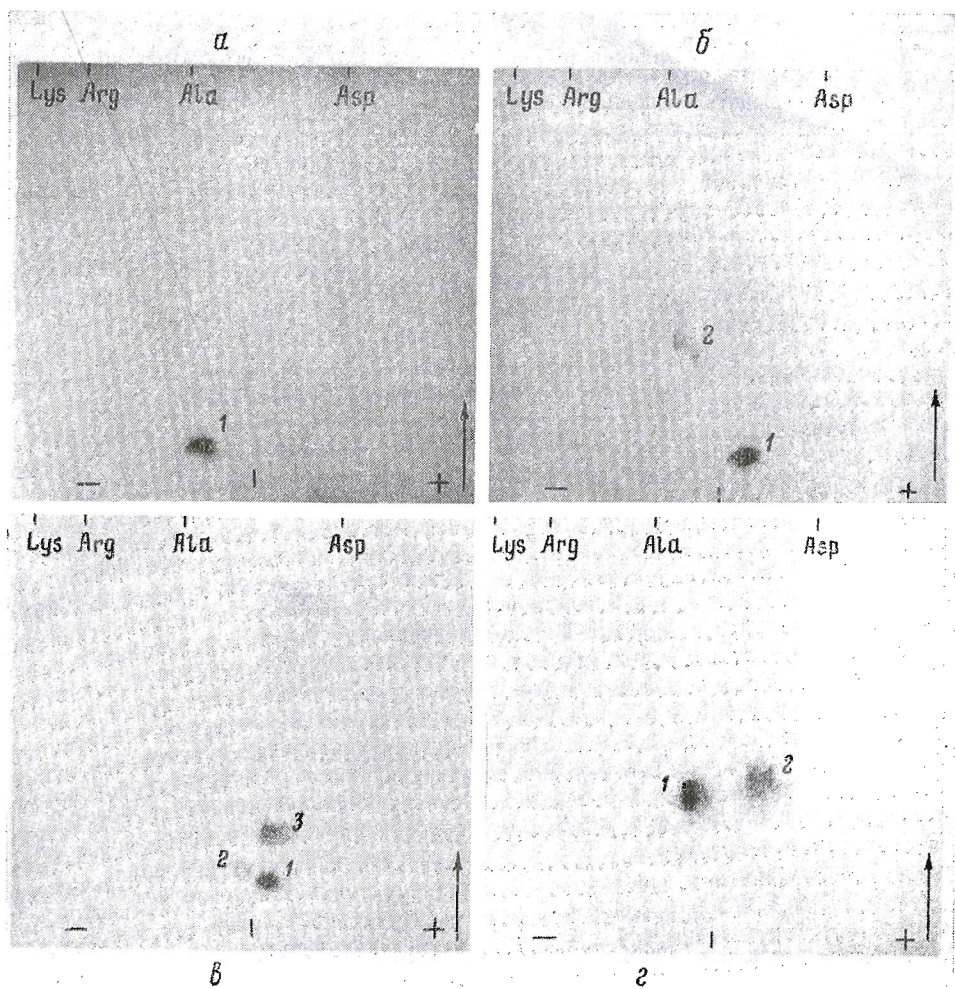


Рис. 1. Радиоавтограммы пептидных карт триптического гидролизата α - (а), β - (б), β' - (в) и σ -субъединиц (г) РНК-полимеразы, карбоксиметилированных в составе холофермента. В верхней части рисунков указана электрофоретическая подвижность аминокислот-стандартов. Отмечены положения пептидов

пептидных карт триптических гидролизатов (рис. 1). Результаты анализа пептидных карт суммированы в табл. 1.

Из 4 остатков цистеина α -субъединицы РНК-полимеразы модифицируется 1 остаток как в индивидуальной субъединице, так и в кор- и холоферменте. В β -субъединице в составе кор- и холофермента из 7 остатков цистеина модифицируются 2, а в индивидуальной субъединице — все 7. Для β' -субъединицы аналогичные значения составляют 3, 3 и 10 из 15 остатков. На пептидной карте триптического гидролизата σ -субъединицы были обнаружены два пятна, однако на основании анализа первичной структуры выделенных пептидов было установлено, что в σ -субъединице модифицируется 1 остаток — цистеин-291 (см. ниже).

Как видно из приведенных данных, только часть остатков цистеина экспонирована в белковых глобулах кор- и холофермента РНК-полимеразы. То, что число карбоксиметилированных остатков цистеина при модификации холофермента значительно ниже, чем при модификации индивидуальных субъединиц, свидетельствует об исключительной компактности упаковки этих единиц в ферменте.

Из триптических гидролизатов α -, β -, β' - и σ -субъединиц, полученных после модификации моноид[^{14}C]уксусной кислотой холофермента РНК-полимеразы, с помощью метода пептидных карт были выделены радиоак-

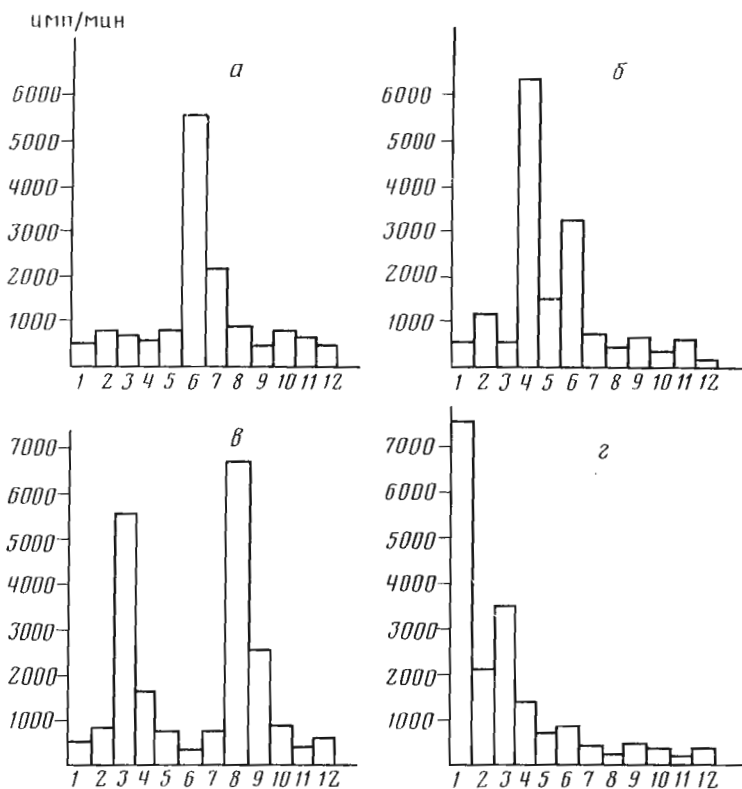


Рис. 2. Радиоактивность Pth-производных аминокислот, полученных при деградации по методу Эдмана смеси пептидов, образовавшихся в результате гидролиза модифицированных в составе холофермента монодоуксусной кислотой и затем N-[¹⁴C]этилмалеимидом β- (а) и β'-субъединицы (б) трипсина, β-субъединицы — химотрипсином (в) и β'-субъединицы протеиназой из *St. aureus* (г). По горизонтали показаны стадии деградации

гидролизovali трипсином и смесь пептидов подвергали деградации по методу Эдмана с измерением радиоактивности (рис. 2а, б).

В табл. 3 и 5 представлена аминокислотная последовательность цистеинсодержащих пептидов β- и β'-субъединиц РНК-полимеразы, образование которых следовало ожидать в результате гидролиза трипсином, исходя из знания первичной структуры [3].

При анализе триптического гидролизата β-субъединицы радиоактивность была зафиксирована на 6-м шаге деградации (рис. 2а). Поскольку единственным пептидом гидролизата, содержащим остаток цистеина в положении 6, является пептид β-T-5 (табл. 3), можно предположить, что модификация N-[¹⁴C]этилмалеимидом в β-субъединице подверглась остаток цистеина-764.

Для подтверждения этого предположения был проведен гидролиз предварительно карбоксиметилированной, а затем модифицированной N-[¹⁴C]этилмалеимидом β-субъединицы РНК-полимеразы химотрипсином. При деградации смеси пептидов по методу Эдмана радиоактивность была зафиксирована на 8-м шаге деградации (рис. 2в), что соответствовало остатку цистеина-764 в пептиде β-Ch-6 (табл. 4). Кроме того, радиоактивность была обнаружена на 3-м шаге, что могло отвечать модификации остатка цистеина-636 в пептиде β-Ch-5 (табл. 4). Поскольку нами было установлено, что остаток цистеина-636 подвергался также карбоксиметилированию моноид [¹⁴C]уксусной кислотой, можно было предположить, что модификация этого остатка N-[¹⁴C]этилмалеимидом произошла в результате неполного карбоксиметилирования. В случае триптического гидролизата модификация остатка цистеина-636 не была обнаружена, потому что он занимает второе с С-конца положение в пептиде β-T-4 (табл. 3).

Аминокислотная последовательность цистеинсодержащих триптических пептидов β -субъединиц РНК-полимеразы *

Пептиды	Аминокислотная последовательность
β -T-1	⁷⁴ Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Phe-Asp-Val-Gln-Glu-Cys-Gln-Ile-Arg ⁸⁵ ⁸⁸
β -T-2	³⁰⁰ Asp-Tyr-Ile-Asp-Glu-Ser-Thr-Gly-Glu-Leu-Ile-Cys-Ala-Ala-Asn- ³¹¹ Met-Glu-Leu-Ser-Leu-Asp-Leu-Leu-Ala-Lys ³²⁴
β -T-3	⁵⁵⁸ ⁵⁵¹ Val-Cys-Pro-Ile-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Pro-Asn-Ile-Gly-Leu-Ile- Asn-Ser-Leu-Ser-Val-Tyr-Ala-Gln-Thr-Asn-Glu-Tyr-Gly-Phe- Leu-Glu-Thr-Pro-Tyr-Arg ⁵⁹¹
β -T-4	⁵⁹⁴ Val-Thr-Asp-Gly-Val-Val-Thr-Asp-Glu-Ile-His-Tyr-Leu-Ser-Ala- Ile-Glu-Glu-Gly-Asn-Tyr-Val-Ile-Ala-Gln-Ala-Asn-Ser-Asn- Leu-Asp-Glu-Glu-Gly-His-Phe-Val-Glu-Asp-Leu-Val-Thr- Cys-Arg ⁶³⁶ ⁶³⁷
β -T-5	⁷⁵⁹ Ser-Asn-Gln-Asn-Thr-Cys-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Cys-Val-Ser- Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Glu-Arg ⁷⁶⁴ ⁷⁷⁰ ⁷⁷⁹
β -T-6	⁸²⁹ Phe-Thr-Thr-Ile-His-Ile-Gln-Glu-Leu-Ala-Cys-Val-Ser-Arg ⁸³⁸ ⁸⁴¹

* Образование этих пептидов постулировано на основании данных по первичной структуре β -субъединицы [3].

При деградации по методу Эдмана триптического гидролизата модифицированной как описано выше β' -субъединицы значительное количество радиоактивности было зафиксировано на 4-м шаге деградации и небольшое на 6-м (рис. 2б), что, вероятно, соответствовало остаткам цистеина-70 и -72 в пептиде β' -T-2 или остаткам цистеина-85 и -366 в пептидах β' -T-3 и β' -T-6 (табл. 5). На основании анализа структуры пептидов, которые должны получаться при гидролизе β' -субъединицы протеиназой из *Staphylococcus aureus* (табл. 6), установлено, что модификации N-[¹⁴C]этилмалеимидом подвергались остатки цистеина-70 и -72 в пептиде β' -St-2. Таким образом, в ДНК-зависимой РНК-полимеразе функционально важными являются остатки цистеина-764 β -субъединицы и -70 и -72 β' -субъединицы или по крайней мере один из них. Интересно, что остатки цистеина-70 и -72 β' -субъединицы входят в кластер, состоящий из 5 остатков цистеина (58, 70, 72, 85 и 88).

В случае α -субъединицы топография остатков цистеина изучалась более детально. С этой целью были использованы «кросс»-сшивающие реагенты: ионы двухвалентной ртути, которые способны взаимодействовать с двумя ближайшими сульфгидрильными группами, а также феррицианид калия, окисляющий близко расположенные остатки цистеина с образованием дисульфидной связи.

Анализ образующихся продуктов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) (рис. 3) показал, что при обработке РНК-полимеразы ионами двухвалентной ртути почти полностью исчезла полоса, соответствующая α -субъединице, а вместо нее появилась полоса, соответствующая белку с меньшей молекулярной массой. Аналогичная полоса обнаруживалась также при обработке ионами ртути свободной α -субъединицы (на рис. 3 не показано). При использовании соли радиоактивного изотопа ртути ²⁰³Hg в этой «легкой» полосе обнаруживалась значительная радиоактивность. При восстановле-

Аминокислотная последовательность цистеинсодержащих пептидов β -субъединицы РНК-полимеразы*

Пептиды	Аминокислотная последовательность
β -Ch-1	81 Asp-Val-Gln-Glu-Cys-Gln-Ile-Arg-Gly-Val-Thr-Tyr ⁹²
β -Ch-2	302 Ile-Asp-Glu-Ser-Thr-Gly-Glu-Leu-Ile-Cys-Ala ^{311 312}
β -Ch-3	311 Ile-Cys-Ala
β -Ch-4	556 Gly-Arg-Val-Cys-Pro-Ile-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Pro-Asn-Ile-Gly-Leu ^{559 561}
β -Ch-5	634 Val-Thr-Cys-Arg-Ser-Lys-Gly-Glu-Ser-Ser-Leu ^{636 644}
β -Ch-6	757 Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asn-Thr-Cys-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Cys-Val-Ser-Leu ^{764 770 773}
β -Ch-7	828 Thr-Thr-Ile-His-Ile-Gln-Glu-Leu-Ala-Cys-Val-Ser-Arg-Asp-Thr-Lys-Leu ^{838 845}
β -Ch-8	837 Ala-Cys-Val-Ser-Arg-Asp-Thr-Lys-Leu ^{838 845}

* См. примечание к табл. 3.

нии полученных после обработки ионами ртути препаратов РНК-полимеразы дитиотреитом «легкая» полоса в них исчезала, но проявлялась полоса, соответствующая α -субъединице (рис. 3).

Полученные результаты дают основание считать, что при обработке РНК-полимеразы ионами ртути происходит внутримолекулярная сшивка α -субъединиц. Увеличение подвижности «сшитой» α -субъединицы при гель-электрофорезе согласуется с литературными данными о том, что белки, имеющие внутримолекулярную сшивку, при SDS-гель-электрофорезе обладают большей подвижностью, чем белки без сшивок такой же молекулярной массы [7]. Это свойство, вероятно, связано с неспособностью «сшитых» белков полностью разворачиваться под действием SDS.

С помощью метода пептидных карт из смеси пептидов, полученных в результате последовательных гидролизом протеиназой *St. aureus* и трипсином α -субъединицы, модифицированной $^{203}\text{HgSO}_4$, был выделен радиоактивный ртутьсодержащий пептид. У выделенного пептида был определен N-концевой аминокислотный остаток (аланин) и аминокислотный состав:

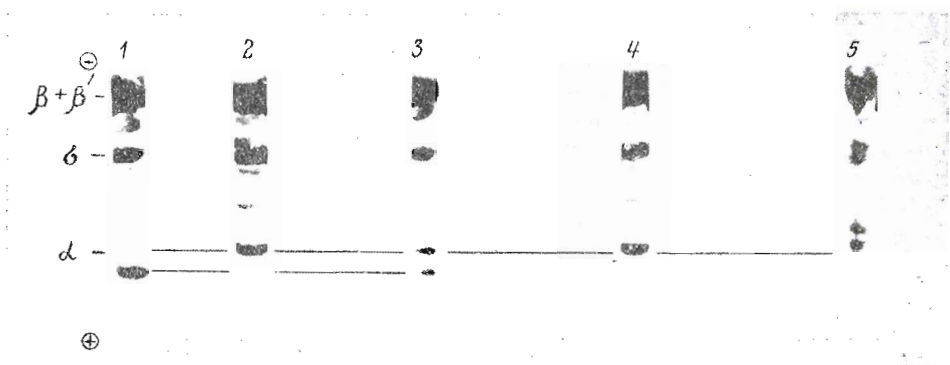


Рис. 3. Электрофорез в градиентном (4–30%) полиакриламидном геле в присутствии 0,1% SDS продуктов, образующихся при обработке РНК-полимеразы «кросс»-сшивающими реагентами: HgSO_4 (1), HgSO_4 , затем дитиотреитом (2), моноiodуксусной кислотой и затем HgSO_4 (3), моноiodацетамидом и затем HgSO_4 (4), феррианидом калия (5). Белки обнаруживали с помощью окраски кумасси R-250

Аминокислотная последовательность цистеинсодержащих триптических пептидов β' -субъединицы РНК-полимеразы *

Пептиды	Аминокислотная последовательность
β' -T-1	⁵⁴ Asp-Gly-Leu-Phe- ⁵⁸ Cys- ⁶⁰ Ala-Arg
β' -T-2	⁶⁷ Asp-Tyr-Glu-Cys- ⁷⁰ Leu-Cys- ⁷² Gly- ⁷⁴ Lys
β' -T-3	⁸² Gly-Val-Ile-Cys- ⁸⁵ Glu- ⁸⁷ Lys
β' -T-4	⁸⁸ Cys-Gly-Val-Glu-Val-Thr-Gln-Thr- ⁹⁶ Lys
β' -T-5	¹⁹¹ Ser-Met-Asp-Leu-Glu-Gln-Glu-Cys- ¹⁹⁸ Glu-Gln-Leu-Leu- ²⁰² Arg
β' -T-6	³⁶³ Leu-Lys-Gln-Cys- ³⁶⁶ Gly-Leu- ³⁷⁰ Pro-Lys
β' -T-7	⁴⁴⁶ Ala-Ile-Gln-Leu-His-Pro-Leu-Val-Cys- ⁴⁵⁴ Ala-Ala-Tyr-Asn-Ala- Asp-Phe-Asp-Gly-Asp-Gln-Met-Ala-Val-His-Val-Pro-Leu- Thr-Leu-Glu-Ala-Gln-Leu-Glu-Ala- ⁴⁸¹ Arg
β' -T-8	⁵¹⁶ Asp-Cys-Val-Asn-Ala- ⁵²⁰ Lys
β' -T-9	⁶⁰¹ Met-Leu-Asn-Thr-Cys- ⁶⁰³ Tyr- ⁶¹⁰ Arg
β' -T-10	⁸⁰⁰ Leu-Val-Asp-Val-Ala-Gln-Asp-Leu-Val-Val-Thr-Glu-Asp-Asp- ⁸¹⁴ Cys-Gly-Thr-His-Glu-Gly-Ile-Met-Met-Thr-Pro-Val-Ile-Glu- Gly-Gly-Asp-Val- ⁸³² Lys
β' -T-11	⁸⁶¹ Asp-Thr-Leu-Leu-His-Glu-Gln-Trp-Cys- ⁸⁶⁹ Asp-Leu-Leu-Glu-Glu- Asn-Ser-Val-Asp-Ala-Val- ⁸⁷¹ Lys
β' -T-12	⁸³⁴ Ser-Val-Val-Ser-Cys- ⁸⁸⁸ Asp-Thr-Asp-Phe-Gly-Val-Cys- ⁸⁹⁵ Ala-His- ⁸⁹⁸ Cys-Tyr-Gly- ⁹⁰¹ Arg

* Образование этих пептидов постулировано на основании данных по первичной структуре β' -субъединицы [4].

Asp 1,1(1), Ser 1,4(1), Pro 0,9(1), Glu 1,3(1), Ala 2,2(2), Cys 1,4(2), Val 0,9(1), Leu 1,2(1), Tyr 0,6(1), Lys 0,9(1). При восстановлении получили два пептида, один из которых при pH 6,5 был заряжен положительно, а другой — отрицательно (рис. 4). На основании анализа N-концевого аминокислотного остатка, аминокислотного состава пептидов, а также первичной структуры цистеинсодержащих пептидов α -субъединицы было установлено, что в образуемой с помощью ионов ртути внутримолекулярной сшивке α -субъединицы участвуют остатки цистеина-269 (пептид I — Ala-Asn-Cys-Leu-Lys) и -176 (пептид II — Ala-Cys-Tyr-Ser-Pro-Val-Glu). Интересно, что после предварительного карбоксиметилирования РНК-полимеразы только одна из α -субъединиц сохраняла способность к «сшивке», а после модификации ноацетамидом «сшивки» не образовывалась вообще (полосы 3 и 4 на рис. 3).

Окисление РНК-полимеразы феррицианидом калия также приводило к ослаблению полосы, соответствующей α -субъединице (полоса 5 на рис. 3). Однако в этом случае электрофоретическая подвижность вновь появляющейся полосы была меньше подвижности α -субъединиц. При восстановле-

**Аминокислотная последовательность цистеинсодержащих пептидов
β'-субъединицы РНК-полимеразы ***

Пептиды	Аминокислотная последовательность
β'-St-1	Arg-Asp-Gly-Leu-Phe-Cys-Ala-Arg-Ile-Phe-Gly-Pro-Val-Lys-Asp-Tyr-Glu ⁶⁹
β'-St-2	Cys-Leu-Cys-Gly-Lys-Tyr-Lys-Arg-Leu-Lys-His-Arg-Gly-Val-Ile-Cys-Glu ⁸⁵ Lys-Cys-Gly-Val-Gln ^{89 90}
β'-St-3	Cys-Glu ^{198 199}
β'-St-4	Tyr-Ser-Gly-Arg-Ser-Val-Ile-Thr-Val-Gly-Pro-Tyr-Leu-Arg-Leu-Lys-Gln ³⁴⁹ Cys-Gly-Leu-Pro-Lys-Lys-Met-Ala-Leu-Glu ^{366 375}
β'-St-5	Gly-Lys-Ala-Ile-Gln-Leu-His-Pro-Leu-Val-Cys-Ala-Ala-Tyr-Asn-Ala-Asp ^{444 454 460}
β'-St-6	Val-Val-Leu-Gly-Leu-Tyr-Tyr-Met-Thr-Arg-Asp-Cys-Val-Asn-Ala-Lys- Gly-Glu ^{506 516 522}
β'-St-7	Leu-Val-Ala-Lys-Thr-Ser-Leu-Lys-Asp-Thr-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ile-Leu- Trp-Met-Ile-Val-Pro-Lys-Gly-Leu-Pro-Tyr-Ser-Ile-Val-Asn-Gln-Ala- Leu-Gly-Lys-Lys-Ala-Ile-Ser-Lys-Met-Leu-Asn-Thr-Cys-Tyr-Arg-Ile- Leu-Gly-Leu-Lys-Pro-Thr-Val-Ile-Phe-Ala-Asp-Gln-Ile-Met- Tyr-Thr-Gly-Phe-Ala-Tyr-Ala-Ala-Arg-Ser-Gly-Ala-Ser-Val-Gly-Ile- Asp-Asp ^{563 608 645}
β'-St-8	Leu-Val-Val-Thr-Glu-Asp-Asp-Cys-Gly-Thr-His-Glu ^{807 814 818}
β'-St-9	Ile-Leu-Val-Pro-Arg-Asp-Thr-Leu-Leu-His-Glu-Gln-Trp-Cys-Asp ^{856 869 870}
β'-St-10	Ala-Val-Lys-Val-Arg-Ser-Val-Val-Ser-Cys-Asp ^{879 888 899}
β'-St-11	Phe-Gly-Val-Cys-Ala-His-Cys-Tyr-Gly-Arg-Asp ^{892 895 898 902}

* См. примечание к табл. 5.

нии окисленного фермента 2-меркаптоэтанолом новая полоса исчезала, а интенсивность полосы α-субъединицы увеличивалась. Увеличение молекулярной массы α-субъединицы при окислении РНК-полимеразы феррицианидом калия свидетельствовало об образовании в этом случае дисульфидной связи между двумя α-субъединицами.

На пептидной карте триптического гидролизата α-субъединицы, полученной из окисленной феррицианидом калия РНК-полимеразы, был обнаружен пептид, который исчезал на пептидной карте белка после его восстановления дитиотреитом. При восстановлении выделенного пептида образовался один положительно заряженный при pH 6,5 пептид (рис. 5). Так как при триптическом гидролизе α-субъединицы может образоваться единственный положительно заряженный цистеинсодержащий пептид²⁶⁹ (Ala-Asn-Cys-Leu-Lys), значит, в образовании дисульфидной связи должны принимать участие остатки цистеина-269. Легкость, с которой происходит модификация остатков цистеина-269 в α-субъединицах, свидетельствует о расположении их на поверхности фермента.

Согласно вторичной структуре α-субъединицы, которая рассчитана с помощью метода Чоа и Фасмана [8], остаток цистеина-269 находится в

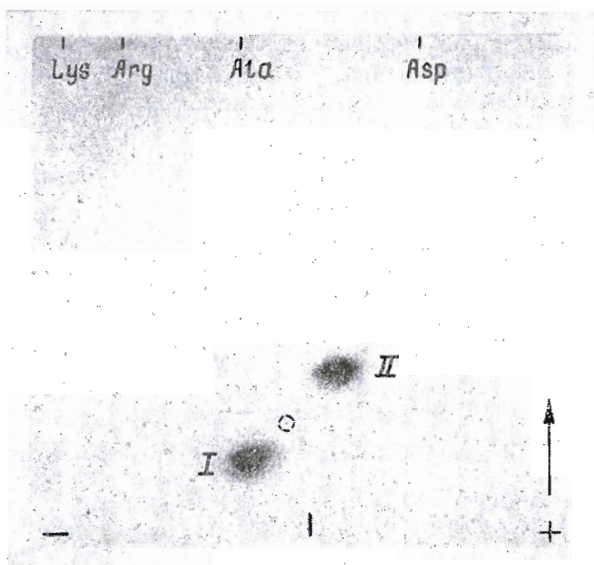


Рис. 4. Пептидная карта цистеинсодержащих пептидов, полученных в результате последовательного гидролиза α -субъединицы трипсином и протениазой из *St. aureus*. Положение цистеинсодержащих пептидов обнаруживали с помощью окраски нингидрином. Положение ртульсодержащего пептида отмечено пунктиром

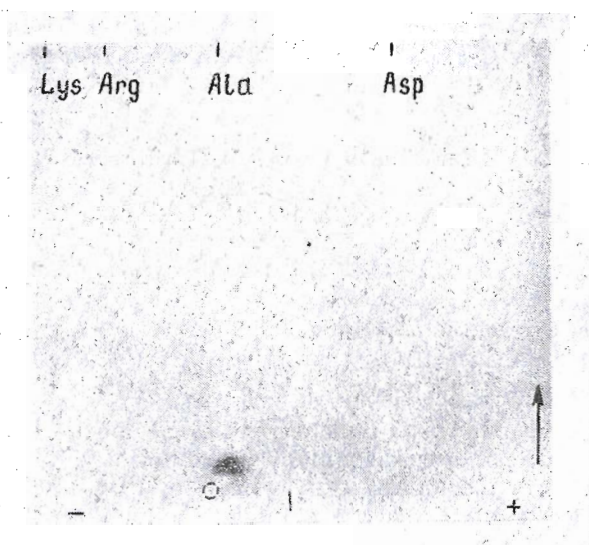
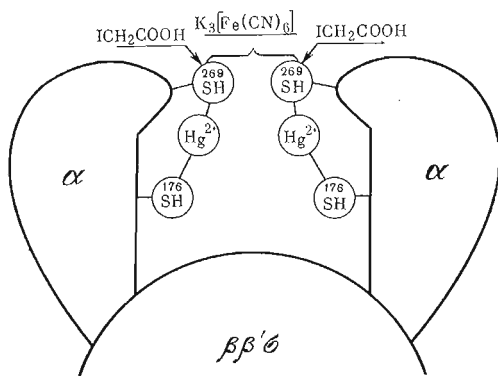


Рис. 5. Положение на пептидной карте пептида, полученного после восстановления цистеинсодержащего пептида, образовавшегося в результате триптического гидролиза α -субъединицы, окисленной феррицианидом калия (положение окисленного пептида показано пунктиром)

одной петле с остатком аргинина-265, который модифицируется при инфекции фагом T4 [9] и тирозином-277, иодируемым в присутствии лактопероксидазы [10]. Вероятно, вся эта петля расположена на поверхности фермента.

Результаты по топографии α -субъединицы можно суммировать в виде следующей модели (рис. 6). Остатки цистеина-269, модифицирующиеся в α -субъединицах кор-фермента, расположены на поверхности РНК-полимеразы и пространственно сближены, поэтому между ними при окислении

Рис. 6. Пространственное расположение SH-групп α -субъединицы РНК-полимеразы и их доступность различным химическим агентам



может образоваться дисульфидная связь, а карбоксиметилирование остатка цистеина-269 в одной α -субъединице препятствует карбоксиметилированию второй α -субъединицы. Пространственно сближены также остатки цистеина-269 и -176, поскольку ионы ртути образуют между ними внутримолекулярную «сшивку».

Экспериментальная часть

В работе использовали 2-меркаптоэтанол, 1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид, додецилсульфат натрия (SDS), кумасси R-250 (Serva, ФРГ), 2-амино-2-гидроксиметилпропандиол-1,3 (трис), моноиодуксусную кислоту, моноацетамид (Merck, ФРГ), реактивы для электрофореза (Bio-Rad, США), этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат, нингидрин (Fluka, Швейцария), пластинки с тонким слоем полиамида F-1700 (Schleicher und Schüll, ФРГ), градиентные (4–30%) полиакриламидные пластинки для электрофореза (Pharmacia, Швейцария), бумагу для хроматографии 3 MM (Whatman, Англия), сцинтиллятор Unisolve 1 (Koch-Light, Англия), моноиод [^{14}C]уксусную кислоту (54 мКи/ммоль), N-[^{14}C]этилмалеимид (42,9 мКи/ммоль), $^{203}\text{HgSO}_4$ (Amersham, Англия), трипсин, обработанный ТРСК, α -химотрипсин (Worthington, США), протеиназу из *St. aureus* (Miles, Англия), сефадекс G-50 (Pharmacia, Швеция), катионообменную смолу AG 501×8 (D) (Bio-Rad, США), реактивы отечественного производства для приготовления буферных растворов категорий ос. ч.

Дистиллированную воду деионизовали на колонках со смолой AG 501×8 (D). Для всех растворов и буферных систем использовали деионизованную воду, перегнанную над нингидрином (0,5 г/л), для проведения кислотных гидролизом — 5,7 н. HCl (ос. ч.), перегнанную над двухлористым оловом (1 г/л).

Кор- и холофермент РНК-полимеразы выделяли из клеток *E. coli* В по методу Берджеса [1], но вместо ДНК-целлюлозы использовали ДНК-агарозу, как описано в работе [11].

Субъединицы РНК-полимеразы разделяли согласно [6].

Модификацию РНК-полимеразы и отдельных субъединиц моноиодуксусной кислотой, моноацетамидом и HgSO_4 проводили как описано в работе [6]. Продукты модификации анализировали с помощью электрофореза в градиентных (4–30%) полиакриламидных пластинках (см. ниже).

При использовании моноиод [^{14}C]уксусной кислоты (удельная радиоактивность 3000 имп/(мин·ммоль)) к 5 нмоль холофермента или отдельных α -, β - и β' -субъединиц добавляли 1 мкмоль реагента, выдерживали 1 ч при 20° С в темноте, реакцию останавливали добавлением большого избытка 2-меркаптоэтанола и белок осаждали трехкратным объемом ацетона.

Модификацию холофермента РНК-полимеразы N-[^{14}C]этилмалеимидом (удельная радиоактивность 3000 имп/(мин·ммоль)) осуществляли при том же соотношении белок — реагент в течение 8 ч при 4° С и обрабатывали

так, как описано для модификации моноиод [^{14}C]уксусной кислотой. Холофермент, модифицированный моноиод [^{14}C]уксусной кислотой или N-[^{14}C]-этилмалеимидом, разделяли на субъединицы на пластинках ацетатцеллюлозы согласно [6]. Используя $^{203}\text{HgSO}_4$ в качестве модифицирующего агента, к 2 нмоль восстановленного дитиотреитом фермента добавляли 40 нмоль $^{203}\text{HgSO}_4$ (удельная радиоактивность 100 000 имп/(мин·нмоль)), выдерживали 2 мин при 20° С и обрабатывали как описано выше.

Окисление холофермента феррицианидом калия. 1 нмоль холофермента переводили в буфер с высокой ионной силой (0,65 М трис-HCl, pH 8,0; 0,4 М NaCl), добавляли феррицианид калия до концентрации 30 мМ и выдерживали 2 ч при 20° С; белок осаждали подкислением уксусной кислотой.

Электрофорез модифицированного Hg^{2+} , моноиодуксусной кислотой, моноиодацетамидом и феррицианидом калия холофермента осуществляли в градиентных (4–30%) полиакриламидных пластинках в буфере, содержащем 55 мМ NaH_2PO_4 , 25 мМ NaOH и 0,1% додецилсульфат натрия, при напряжении 80 В в течение 3–4 ч (окраска 0,25% кумасси).

*Ферментативный гидролиз РНК-полимеразы трипсином, химотрипсином и протеиназой из *St. aureus** проводили в 0,1–0,2 М бикарбонате аммония (pH 7,9–8,1) при 37° С и соотношении фермент — субстрат 1:30 — 1:50. Время гидролиза трипсином и химотрипсином составляло 4–6 ч, а протеиназой из *St. aureus* — 12 ч. По окончании реакции гидролизат лиофилизовали.

Хроматография и электрофорез на бумаге. Для выделения пептидов, полученных при ферментативном гидролизе субъединиц, использовали метод пептидных карт на бумаге 3 ММ. Электрофорез проводили 1 ч в системе пиридин — уксусная кислота — вода (25:1:225) при pH 6,5 и напряжении 500 В. Хроматографию вели в системе пиридин — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10:15:3:12). Для детекции радиоактивных пятен использовали радиоавтографию на рентгеновской пленке РМ-1. Пленку обрабатывали стандартным проявителем. Радиоактивные пятна и пептиды элюировали 10% уксусной кислотой.

N-Концевые аминокислотные остатки пептидов определяли в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (Dns) производных по методу Грея [12]. При работе с микроколичествами пептидов дансильрование проводили по методу [13]. Dns-производные аминокислот идентифицировали двумерной микронокислойной хроматографией на силикагеле [14].

Для определения аминокислотного состава пептидов проводили кислотный гидролиз 5,7 н. HCl в течение 24 ч. Триптофан определяли при помощи цветной реакции с фруктозой [15] и спектрофотометрически [16]. Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе D-500 (Durrum, США).

Дегградацию пептидов с идентификацией аминокислот в виде фенилтиогидантоинов осуществляли по методу [17], а в виде 4-N,N-диметиламиноазобензолтиогидантоинов — по методу [18].

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес к этой работе и помощь при ее выполнении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burgess R. R., Jendrisak J. J. Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 4634–4638.
2. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чергов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С., Шуваева Т. М. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 283–286.
3. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Чергов О. Ю., Модянов Н. Н., Гришкевич В. А., Макарова И. А., Марченко Т. В., Половникова И. Н., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. Докл. АН СССР, 1980, т. 253, № 4, с. 995–998.
4. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Соломатина И. С., Шуваева Т. М., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. Докл. АН СССР, 1981, т. 261, № 3, с. 763–768.
5. Burton Z., Burgess R. R., Lin J., Moore D., Holder S., Gross C. A. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 12, p. 2889–2903.
6. Чергов О. Ю., Селюченко О. А., Липкин В. М. Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 4, с. 492–498.

7. Steele J. C. H., Jr., Nielsen T. B. *Anal. Biochem.*, 1978, v. 84, № 1, p. 218–224.
8. Chou P. J., Fasman G. D. *Biochemistry*, 1974, v. 13, № 2, p. 222–245.
9. Goff C. G. J. *Biol. Chem.*, 1974, v. 249, № 19, p. 6181–6190.
10. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Кочергинская С. А., Никифоров В. Г., Лебедев А. Н. *Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 6, с. 929–935.
11. Lowe P. A., Hager D. A., Burgess R. R. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 7, p. 1344–1352.
12. Gray W. R. In: *Method in enzymol.*/Ed. Hirs C. H. W. N. Y.—L.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 139–151.
13. Bruton C. J., Hartley B. S. *J. Mol. Biol.*, 1970, v. 52, № 2, p. 165–178.
14. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. *Докл. АН СССР*, 1967, т. 172, № 1, с. 91–93.
15. Messineo L., Mussara E. *Int. J. Biochem.*, 1972, v. 3, p. 700–704.
16. Edelhoch H. *Biochemistry*, 1967, v. 6, № 7, p. 1948–1954.
17. Schroeder W. A. In: *Methods in enzymol.*/Ed. Hirs C. H. W. N. Y.—L.: Acad. Press, 1967, v. XI, p. 445–461.
18. Chang J. Y., Creaser E. H., Bentley K. N. *Biochem. J.*, 1976, v. 153, № 3, p. 607–611.

Поступила в редакцию
22.XI.1984

TOPOGRAPHY OF CYSTEIN RESIDUES IN THE DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE

SELUTCHENKO O. A., CHERTOV O. Yu., LIPKIN V. M.

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

Chemical modification of DNA-dependent RNA polymerase with monoiod-[¹⁴C]acetic acid and N-[¹⁴C]ethylmaleimide has been carried out and position of superficial and functionally important as well as enzymatically non-significant, exposed cystein residues have been localised in the enzyme. Topography of cystein residues in the RNA-polymerase α -subunit is thoroughly studied. The results are summarized in a model.