



УДК 577.152.277*6'13 : 577.112.4

РОЛЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ
ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

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

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

Проведена химическая модификация сульфгидрильных групп ДНК-зависимой РНК-полимеразы *Escherichia coli* алкилирующими и ртутидержащими соединениями. Показано, что иодуксусная кислота и иодацетамид не влияют на активность фермента, а *N*-этилмалеимид и ртутидержащие соединения ингибируют катализируемый им синтез РНК. РНК-полимераза, модифицированная ионами Hg^{2+} , теряет способность связываться с промоторсодержащими фрагментами ДНК. Кроме того, ионы ртути ингибируют и стадию элонгации РНК. Выдвинуто предположение об участии SH-групп фермента в процессе расплетания двухцепочечной цепи ДНК. Показано, что SH-группы β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы участвуют в связывании двухцепочечных фрагментов ДНК.

В бактериальной клетке синтез всех видов РНК осуществляет универсальный фермент — ДНК-зависимая РНК-полимераза. Многостадийность и разнообразие механизмов транскрипции определяют сложность структуры катализирующего этот процесс фермента. Холофермент РНК-полимеразы *E. coli* состоит из двух α -субъединиц (M_r 36 500), β - и β' -субъединиц (M_r 150 000 и 155 000) и фактора инициации σ (M_r 70 000).

В молекуле РНК-полимеразы отсутствуют дисульфидные связи [1], при этом сульфгидрильные группы существенны для сохранения активности фермента [2]. При окислении SH-групп активность фермента снижается вплоть до полной его инактивации. Модификация тиолспецифичными реагентами во многих случаях также ингибирует активность РНК-полимеразы [3].

Ранее изучалась модификация сульфгидрильных групп РНК-полимеразы различными реагентами: *n*-хлормеркурибензоатом, иодуксусной кислотой, иодацетамидом, *N*-этилмалеимидом [3], 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой), тетрагидратом натрия [2]. Было показано, что модификация 3–4 SH-групп не влияет на активность РНК-полимеразы [4, 5] и что почти полная инактивация фермента в зависимости от используемого модифицирующего агента наблюдается в результате титрования 8 [5], 12 [4] или 21 [2] SH-групп.

Противоречивые результаты были получены при исследовании роли SH-групп РНК-полимеразы при взаимодействии ее с матричной ДНК, а также способности ДНК защищать фермент от инактивации. Так, по данным Кракова и Смита [6, 7], модификация фермента *n*-хлормеркурибензоатом не препятствует его взаимодействию с матрицей, в то время как Ишихама [3] обнаружил, что такая обработка приводит к ингибированию связывания РНК-полимеразы с ДНК фага T7. Согласно данным Кинга и Никольсона [1], при титровании преинициаторного комплекса РНК-полимераза — ДНК 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) фермент сохранял ~50% активности, однако в работе [8] показано, что ДНК не защищала SH-группы фермента от модификации 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой).

Разногласия в полученных результатах, а также сравнительно небольшой объем экспериментальных данных оставили открытым вопрос о значении сульфгидрильных групп в процессе функционирования РНК-полимеразы. Было неясно, в каких именно стадиях синтеза РНК принимают

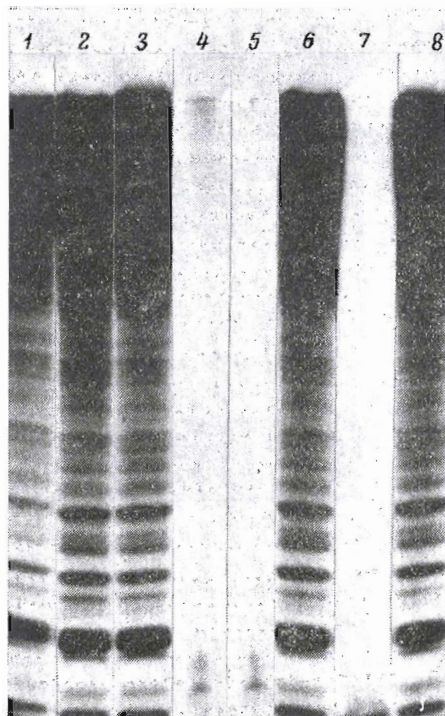


Рис. 1. Влияние модификации остатков цистеина в РНК-полимеразе на катализируемый ею синтез олигонуклеотидов на *Bsu*I-фрагменте ДНК фага Т7. Электрофоретическое разделение на 25% полиакриламидном геле олигонуклеотидов, синтезируемых нативной РНК-полимеразой (1), также ферментом, модифицированным моноиодуксусной кислотой (2), моноацетамидом (3), N-этилмалеимидом (4), Hg^{2+} (5), *n*-хлормеркурибензоатом (7). В опытах 6 и 8 перед добавлением субстратов фермент, модифицированный Hg^{2+} и *n*-хлормеркурибензоатом соответственно, был обработан дитиотреитом

участие сульфгидрильные группы фермента и какова их функциональная роль. Ничего не известно также и о локализации функционально важных SH-групп в молекуле фермента.

Данная работа предпринята с целью выяснения функциональной роли остатков цистеина в ДНК-зависимой РНК-полимеразе *E. coli*. нас интересовало, в каких стадиях процесса транскрипции и каким образом участвуют сульфгидрильные группы фермента, а также местоположение функционально важных SH-групп в полипептидных цепях субъединиц РНК-полимеразы.

Изучалось влияние химической модификации РНК-полимеразы различными алкилирующими (иодуксусная кислота, иодацетамид, N-этилмалеимид) и ртутьсодержащими (*n*-хлормеркурибензоат, соли двухвалентной ртути) агентами на ее активность. Об активности фермента после модификации судили по его способности осуществлять синтез олигонуклеотидов на двухцепочечной матрице — *Bsu*I-фрагменте ДНК фага Т7.

Установлено, что модификация иодуксусной кислотой и иодацетамидом не приводит к заметному снижению активности фермента, в то время как ртутьсодержащие реагенты и N-этилмалеимид полностью подавляют синтез РНК (рис. 1). Добавление дитиотреита сопровождается полным восстановлением активности РНК-полимеразы, модифицированной ртутьсодержащими соединениями.

С целью выявления стадии транскрипции, которая подавляется в результате модификации SH-групп РНК-полимеразы, изучали взаимодействие модифицированного фермента с матричной ДНК, в частности исследовали способность образовывать «открытые» комплексы с промоторсодержащими фрагментами ДНК, полученными после расщепления плазмиды рOD 162 ферментами рестрикции *Sal*I и *Eco*RI. При этом наблю-

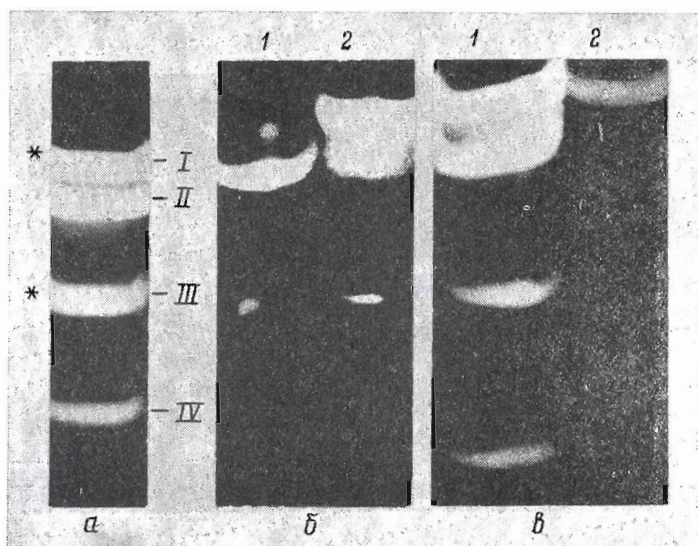


Рис. 2. Влияние модификации РНК-полимеразы ионами ртути на ее способность связываться с промоторными участками ДНК. а — разделение *EcoRI* — *SalI*-фрагментов плазмиды рОD 162 в 6% полиакриламидном геле (окраска этидиумбромидом). Звездочкой отмечены фрагменты, содержащие промоторы. Анализ способности фрагментов плазмиды рОD 162 взаимодействовать с нативной РНК-полимеразой (б) и РНК-полимеразой, модифицированной Hg^{2+} (в). 1 — фрагменты, содержащиеся в фильтрате; 2 — фрагменты, задерживающиеся на нитроцеллюлозных фильтрах (см. «Экспер. часть»)

дали образование четырех фрагментов, два из которых, I и III (4200 и 560 н.п.), содержали промоторы, а два других, II и IV (2369 и 505 н.п.), не содержали (рис. 2).

Для выявления наличия специфичных «открытых» комплексов использовалось свойство таких комплексов, в противоположность свободным фрагментам ДНК, а также неспецифичным комплексам, задерживаться на нитроцеллюлозных фильтрах [9]. При фильтровании смеси полученных фрагментов ДНК, преинкубированных с нативной РНК-полимеразой, на нитроцеллюлозных фильтрах были обнаружены фрагменты I и III, содержащие промоторы. Особенно хорошо задерживался фрагмент I, содержащий в своем составе три промотора. В случае же РНК-полимеразы, модифицированной ионами ртути, все фрагменты оказывались в элюате (рис. 2). Следовательно, ионы ртути действовали на РНК-полимеразу таким образом, что она теряла способность образовывать «открытые» комплексы.

Известно, что при образовании специфичного комплекса РНК-полимеразы с промотором происходит изменение свойств фермента, проявляющееся в увеличении его устойчивости к ряду воздействий, а также изменение свойств ДНК [10, 11]. В частности, происходит локальное расплетание двойной спирали ДНК в месте присоединения РНК-полимеразы. Показано, что в последнем процессе РНК-полимераза играет активную роль [12].

Логично предположить, что в процессе расплетания двойной спирали ДНК активно участвуют остатки цистеина ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Для проверки такого предположения было проведено сравнительное изучение влияния модификации SH-групп фермента на синтез олигонуклеотидов на одно- и двухцепочечных матрицах. В качестве двухцепочечной матрицы использовался *Bsul*-фрагмент ДНК фага Т7, а в качестве одноцепочечной — poly(dT). Полученные результаты (рис. 3) свидетельствуют о том, что синтез РНК на одноцепочечной матрице ингибируется ионами ртути и N-этилmaleимидом значительно слабее. Таким образом, ингибирование синтеза РНК на двухцепочечной матрице после модификации РНК-

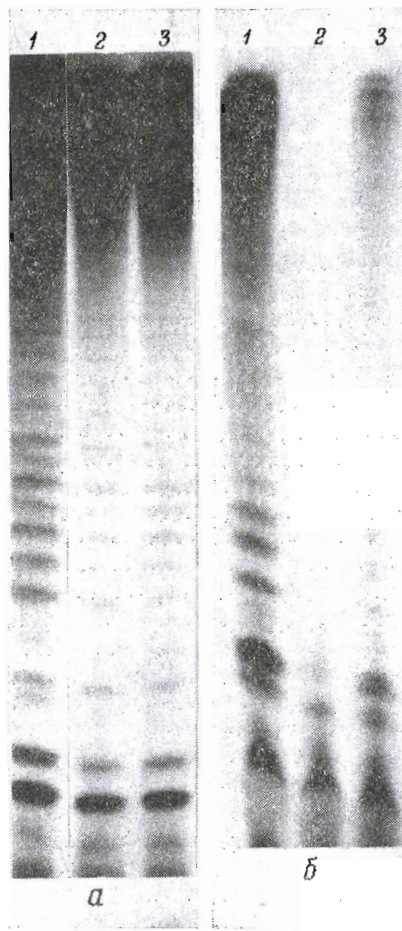


Рис. 3. Влияние модификации РНК-полимеразы ионами Hg^{2+} и N-этилмалеимидом на синтез РНК, осуществляемый ею на poly(dT) (а) и *BsuI*-фрагменте ДНК фага Т7 (б). Электрофоретическое разделение на 25% полиакриламидном геле олигонуклеотидов, синтезируемых нативной РНК-полимеразой (1), РНК-полимеразой, модифицированной ионами Hg^{2+} (2), и РНК-полимеразой, модифицированной N-этилмалеимидом (3)

полимеразы ионами ртути или N-этилмалеимидом, вероятно, обусловлено потерей ферментом способности «расплетать» двойную спираль ДНК. Синтез же РНК на одноцепочечной матрице, где не требуется стадия расплетания, затрагивается незначительно.

Поскольку расплетание цепей ДНК происходит и в процессе элонгации, было интересно выяснить, не влияет ли модификация SH-групп и на процесс элонгации цепи РНК. С этой целью проводили модификацию ионами ртути РНК-полимеразы, находящейся в транскрибирующем комплексе, с одновременным добавлением рифампицина для предотвращения процесса реинициации.

Добавление ионов ртути останавливает синтез всех РНК-продуктов (рис. 4). Следовательно, ионы ртути действуют и на молекулы РНК-полимеразы, осуществляющие элонгацию РНК. Вероятно, что в этом случае ингибирующее действие ионов ртути связано с тем, что модифицированный фермент не способен расплетать цепи ДНК.

С целью выяснения локализации функционально важных остатков цистеина в субъединицах РНК-полимеразы проводили модификацию сульфгидрильных групп фермента N-этилмалеимидом. Субъединицы разделяли электрофорезом на ацетатцеллюлозе и далее осуществляли «смешанную» реконструкцию модифицированных субъединиц с немодифицированными.



Рис. 4

Рис. 4. Ингибирование ионами ртути элонгации РНК. Электрофоретическое разделение олигонуклеотидов на 25% полиакриламидном геле. Через 2 мин после начала синтеза РНК РНК-полимеразой на *BsuI*-фрагменте ДНК фага Т7 в каждую пробу добавлено: 1 — [α - 32 P]УТР, рифампицин, Hg^{2+} ; 2 — [α - 32 P]УТР; 3 — [α - 32 P]УТР, рифампицин

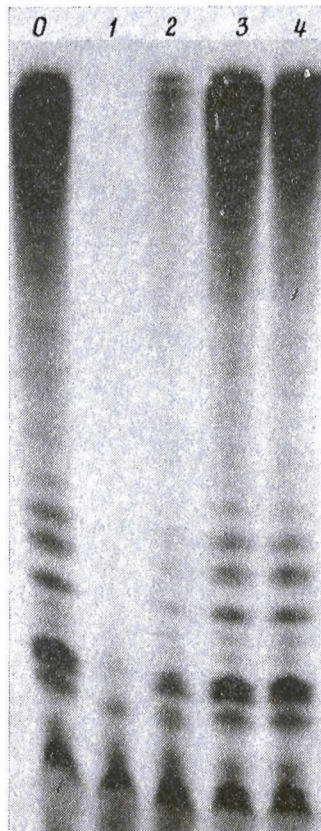


Рис. 5

Рис. 5. Роль сульфгидрильных групп различных субъединиц РНК-полимеразы в процессе транскрипции. Разделение олигонуклеотидов, синтезируемых РНК-полимеразой с модифицированными остатками цистеина в β - (1), β' - (2), α - (3) и σ -субъединицах (4) на *BsuI*-фрагменте ДНК фага Т7. 0 — контрольный синтез с помощью немодифицированного фермента

Об активности реконструированных ферментов судили по синтезу олигонуклеотидов (рис. 5). Как видно из рис. 5, в РНК-полимеразах с модифицированными остатками цистеина в α - или σ -субъединицах ферментативная активность полностью сохранялась. В тех же случаях, когда в РНК-полимеразе модифицированы остатки цистеина в β - или β' -субъединицах, фермент терял активность на двухцепочечной матрице. Следовательно, остатки цистеина β - и β' -субъединиц необходимы для функционирования ДНК-зависимой РНК-полимеразы. При этом эксперименты по осаждению комплексов ДНК—РНК-полимераза на нитроцеллюлозных фильтрах с последующим анализом их с помощью электрофореза в агарозе (результаты не приведены) показали, что РНК-полимераза с модифицированными остатками цистеина в β - или β' -субъединицах не связывалась с двухцепочечной ДНК.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что в β - и β' -субъединицах ДНК-зависимой РНК-полимеразы имеются остатки цистеина, которые играют важную роль в процессах взаимодействия фермента с ДНК-матрицей и элонгации, участвуя, вероятно, в процессе расщепления цепей ДНК.

Локализация остатков цистеина, участвующих в этом процессе, является предметом следующего сообщения [13].

Экспериментальная часть

В работе использовали дитиотреит, додецилсульфат натрия, EDTA, N-этилмалеимид, этидиумбромид (Serva, ФРГ), трис, моноиодуксусную кислоту, моноиодацетамид (Merck, ФРГ), акриламид, N,N'-метиленис-акриламид (Bio-Rad, США), 30% бычий сывороточный альбумин (Difco, США), СТР, АТР, ГТР, УТР (Reanal, Венгрия), [α - 32 P]УТР (410 Ки/ммоль, Amersham, Англия), poly(dT) (P-L Biochem., США), рифампицин (Sigma, США), сульфат ртути (ос. ч.). *BsuI*-фрагмент ДНК фага Т7 был любезно предоставлен М. А. Грачевым (Институт органической химии СО АН СССР).

Реактивы советского производства для приготовления буферных и других растворов использовали категорий ос. ч. или х. ч.

РНК-полимеразу (РНК-нуклеотидилтрансфераза (ДНК-зависимая), КФ 2.7.7.6) выделяли из клеток *E. coli* по методу Берджеса [14], но вместо ДНК-целлюлозы использовали ДНК-агарозу, как описано в работе [15].

Субъединицы РНК-полимеразы разделяли с помощью электрофореза на ацетатцеллюлозе. В качестве исходного материала для получения ацетатцеллюлозных блоков использовали диацетатцеллюлозу с содержанием уксусной кислоты 54,9%, выпускаемую ВНИИСС (г. Владимир). Нагрузка белка на пластинку (100×150×3 мм) составляла 2,5 мг. Электрофорез в горизонтальном направлении проводили в буфере 0,6 М борная кислота — аммиак (рН 8,9), содержащем 0,01 М EDTA, в течение 6–8 ч при напряжении 500 В. Белок элюировали из ацетатцеллюлозы 30-мин центрифугированием при 8000 об/мин. Раствор белка обессоливали на колонке (1××45 см) с сефадексом G-50, уравновешенным 0,1 М NH₄HCO₃. Выход субъединиц составлял 50%.

Реакцию модификации РНК-полимеразы моноиодуксусной кислотой, моноиодацетамидом, N-этилмалеимидом, n-хлормеркурибензоатом и HgSO₄ осуществляли в буфере, содержащем 40 мМ трис-HCl (рН 7,9), 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ KH₂PO₄, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит. Конечные концентрации в реакционной смеси (время модификации, температура): РНК-полимеразы — 4 мкМ, моноиодуксусной кислоты, моноиодацетамид — 1 мМ (1 ч, 20°С), N-этилмалеимида — 1 мМ (8 ч, 4°С), HgSO₄ — 80 мкМ (2 мин, 20°С), n-хлормеркурибензоата — 30 мкМ (2 мин, 20°С). Об активности модифицированной РНК-полимеразы судили по ее способности синтезировать олигонуклеотиды.

*Синтез РНК проводили в течение 20 мин при 37°С в буферном растворе, содержащем 40 мМ трис-HCl (рН 7,9), 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ KH₂PO₄, 1 мМ дитиотреит, 0,05% бычьего сывороточного альбумина, 200 мкМ ГТР, 200 мкМ АТР, 40 мкМ СТР, 40 мкМ УТР (200 мкКи/мл [α - 32 P]УТР), 20 мкг/мл *BsuI*-фрагмента ДНК фага Т7 (или 4 мкг/мл poly(dT)) и 100 мкг/мл РНК-полимеразы. Синтез РНК останавливали добавлением равного объема буферного раствора с 100 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфатом натрия, 7 М мочевиной, 50 мМ трис-боратом (рН 8,3). Синтезированные олигонуклеотиды разделяли в течение 5 ч с помощью электрофореза в пластинах 25% полиакриламидного геля (1,5×200××400 мм) в буфере 1 М трис — 1 М H₃BO₃ (рН 8,3), содержащем 0,02 М EDTA, в присутствии 8 М мочевины при напряжении 1000 В. Для радиоавтографии использовали рентгеновскую пленку РМ-1.*

*Промоторсодержащие фрагменты ДНК получали, используя плазмиду роD 162. Расщепление ДНК ферментом *SalI* проводили в буфере с 6 мМ трис-HCl (рН 7,5), 6 мМ MgCl₂, 6 мМ 2-меркаптоэтанолом, 150 мМ NaCl, в течение 1 ч при 37°С, а ферментом *EcoRI* — в буфере с 100 мМ трис-HCl (рН 7,5), 5 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанолом в течение 1 ч при 37°С, используя 1 ед. акт. фермента на 1 мкг ДНК. Конечная концентрация ДНК в реакционной смеси 0,3 мг/мл.*

Связывание РНК-полимеразы (нативной и модифицированной Hg²⁺) с фрагментами ДНК проводили в буфере с 150 мМ KCl, 40 мМ трис-HCl (рН 7,9), 13 мМ MgCl₂, 0,1 мМ дитиотреитом, 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, в течение 10 мин при 37°С. Соотношение фермент — ДНК составляло 3 : 1 по весу. Комплексы фильтровали на нитроцеллюлозе

ных фильтрах с последующей элюцией их (10 ч, 37° С) буфером с 500 мМ ацетатом аммония, 10 мМ ацетатом магния, 0,1% додецилсульфатом натрия, 0,1 мМ EDTA. Фрагменты ДНК разделяли 1 ч в 6% полиакриламидном геле в присутствии 8 М мочевины, как описано выше, или в 1% агарозе в буфере с 40 мМ трис-НСl (рН 7,8–8,2), 20 мМ уксусной кислотой. 40 мМ EDTA, при силе тока 100 мА. Окраску геля проводили этидиумбромидом в течение 15 мин.

Влияние ионов ртути на элонгацию РНК. РНК-полимеразу (4 мкМ), находящуюся в транскрибирующем комплексе (см. Синтез РНК, время 2 мин), обрабатывали HgSO₄ (20 мкМ) и одновременно 10-кратным мольным избытком рифампицина по отношению к ферменту (20 мкг/мл), инкубировали 20 мин при 37° С. Синтезированные олигонуклеотиды разделяли с помощью электрофореза в пластинах 25% полиакриламидного геля в присутствии 8 М мочевины.

Для получения гибридных РНК-полимераз субъединицы нативного холофермента и фермента после модификации сульфгидрильных групп N-этилmaleимидом разделяли препаративным электрофорезом в ацетатцеллюлозных блоках как описано выше. Реконструкцию субъединиц проводили с помощью диализа смеси требуемого состава модифицированных и немодифицированных субъединиц против буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 7,9), 10 мМ MgCl₂, 500 мМ KCl, 100 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 50% глицерин, в течение 4 ч при 4° С. Об активности реконструированных РНК-полимераз судили по осаждению комплексов ДНК – РНК-полимераза на нитроцеллюлозных фильтрах [9] или по синтезу олигонуклеотидов, как описано выше.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nicholson B. H., King A. M. Q.* Eur. J. Biochem., 1973, v. 37, № 3, p. 575–584.
2. *Yarborough L. R., Wu C.-W. J.* Biol. Chem., 1974, v. 249, № 13, p. 4079–4085.
3. *Ishichama A., Hurwitz J. J.* Biol. Chem., 1969, v. 244, № 24, p. 6680–6689.
4. *Sumegi J., Sannar T., Pihe A.* FEBS Lett., 1971, v. 16, № 2, p. 125–127.
5. *Harding J. D., Beychok S.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 51, № 3, p. 711–717.
6. *Smith D. A., Martinez A. M., Ratliff R. L. J.* Mol. Biol., 1971, v. 60, № 2, p. 395–400.
7. *Krakow J. S.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 20, p. 4522–4527.
8. *Daroszy A., Damjanovich S.* Abstr. Comm. 9th Meet. FEBS, 1974, p. 177.
9. *Melancon P., Burgess R. R., Record M. T.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 18, p. 4318–4331.
10. *Anthony D. D.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, v. 56, № 3, p. 1026–1033.
11. *Хесил П., Астаурова О., Шемякин М. Ф., Камзолова С., Маляков В.* Молекулярн. биология, 1967, т. 1, № 5, с. 736–753.
12. *Никифоров В. Г.* Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 2, с. 159–174.
13. *Селюченко О. А., Чергов О. Ю., Липкин В. М.* Биоорг. химия, 1985, т. 11, № 4, с. 480–491.
14. *Burgess R. R., Jendrisak J. J.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 21, p. 4634–4638.
15. *Lowe P. A., Hager D. A., Burgess R. R.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 7, p. 1344–1352.

Поступила в редакцию
22.XI.1984

THE ROLE OF SULFHYDRYL GROUPS IN THE FUNCTION OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE

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

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

Sulfhydryl groups of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase were chemically modified with alkylating and mercuric-containing compounds. Iodoacetic acid and iodoacetamide were shown not to affect the enzymatic activity; whereas N-ethylmaleimide and mercuric-containing compounds completely inhibit the RNA synthesis. RNA polymerase modified with mercuric ions loses the ability of binding with promoter – containing DNA fragments. Moreover, mercuric ions inhibit the RNA elongation stage. Suggestion is made the Cys residues of RNA polymerase play a key role in double-stranded DNA unwinding. It is shown that SH-groups of β - and β' -subunits participate in the binding with double-stranded fragments of DNA.