



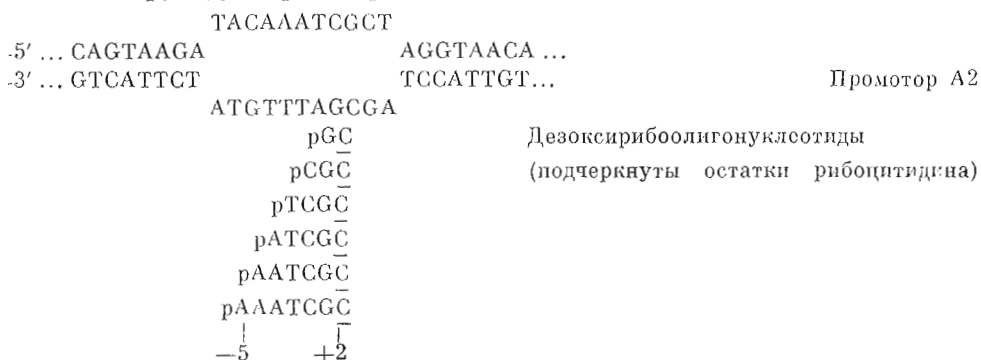
УДК 577.152.277'145:577.112.4

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* В КОМПЛЕКСЕ С ПРОМОТОРОМ ФОСФОРИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ-ЗАТРАВОК

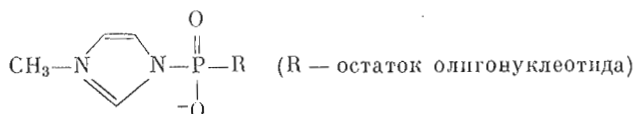
Грaчев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кутявин И. В.,
Царев И. Г.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Олигонуклеотиды, комплементарные кодогенной цепи промотора А2 фага Т7 в области $-8...+2$ включаются в продуктивный тройной комплекс [промотор · РНК-полимераза · олигонуклеотид] и элонгируются ферментом при добавлении нуклеозид-5'-трифосфатов [1]. В настоящей работе по модифицированной триэфирной схеме [2] было синтезировано несколько таких олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 3'-концевое рибозитидиновое звено, которое вводили как описано в работе [1]. Ниже приведены структуры промотора А2 и синтезированных олигонуклеотидов:

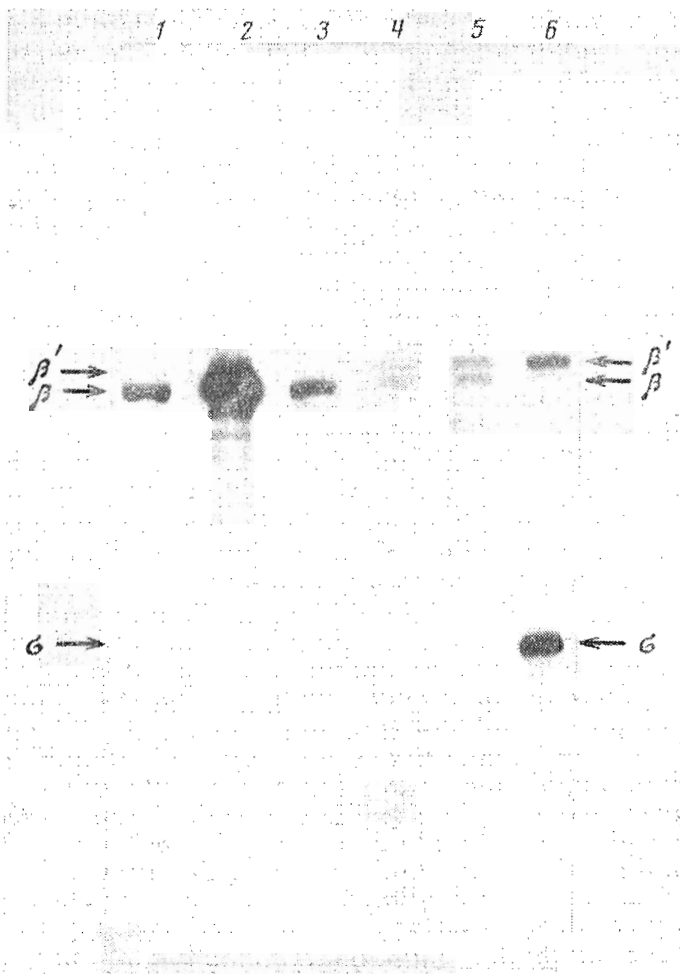


Из этих олигонуклеотидов методом [3] были получены фосфорилирующие производные — 5'-(N-метил)имидазолиды, использованные для исследования РНК-полимеразы методом аффинной модификации.



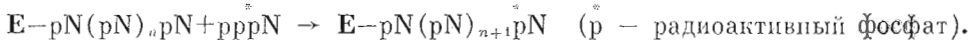
Рестрикционный фрагмент ДНК фага Т7 ($5 \cdot 10^{-7}$ М), содержащий промотор А2 [4], инкубировали с РНК-полимеразой *E. coli* ($5 \cdot 10^{-7}$ М) 2 мин при 37°C в 25 мМ Нерес (рН 7,8), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ меркаптоэтанол. Затем добавляли метилимидазолид одного из указанных олигонуклеотидов ($2 \cdot 10^{-4}$ М) и инкубировали 90 мин при 37°C , добавляли рифампицин (10^{-4} М) и через 10 мин — $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (2000 Ки/ммоль, $5 \cdot 10^{-7}$ М). При такой обработке сначала происходило ковалентное присоединение олигонуклеотида к РНК-полимеразе (путем фосфорилирования нуклеофильного аминокислотного остатка 5'-концевой фосфатной группой), а затем, после добавления $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, некоторые из ковалентно связанных с белком остатков олигонуклеотидов (те, что заняли подлежащее положение относительно активного центра синтеза фос-

Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия.



Модификация РНК-полимеразы N-метилимидазолидами олигонуклеотидов (анализ электрофорезом в ПААГ): GC (1), CGC (2), TCGC (3), ATCGC (4), AATCGC (5) и AATCGC (6) в сочетании с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. Стрелками указаны положения субъединиц немодифицированной РНК-полимеразы, выявленные путем окрашивания геля

фодифирной связи) удлинялись на одно радиоактивное звено:



Поскольку эта реакция происходила в активном центре фермента при его каталитическом воздействии, достигалась высокая селективность аффинного мечения. Подобный прием с аффинными реагентами, аналогами нуклеозид-5'-трифосфатов, был использован ранее в работах [5, 6].

Через 10 мин после добавления $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ реакцию останавливали добавлением 1/4 объема раствора состава: 5% SDS — 5% меркаптоэтанол — 0,5% бромфеноловый синий — 50% глицерин, прогревали при 56° С и подвергали микроэлектрофорезу в полиакриламидном геле [7] по Лэммли [8] (разделяющий гель — 6% ПААГ, концентрирующий гель — 3% ПААГ) в присутствии 0,1% SDS. Из рисунка видно, что с увеличением длины олигонуклеотида картина аффинного мечения закономерно изменяется. В таблице приведены значения радиоактивностей (за вычетом фона) вырезанных из геля зон субъединиц, определенные с помощью сцинтилляционного счетчика. Обращает на себя высокая относительная эффективность аффинного мечения β -субъединицы в случае производного тринуклеотида и σ -субъединицы в случае производного гептануклеотида. Однако следует иметь в виду, что во всех случаях

Аффинное мечение субъединиц РНК-полимеразы

Аффинный реагент **	Субъединица *					
	β		β'		σ	
	радиоактивность, имп/мин	модифицируемый остаток	радиоактивность, имп/мин	модифицируемый остаток	радиоактивность, имп/мин	модифицируемый остаток
XpCGC	1 700	His+Lys	0		0	
XpCGC	33 000	His	0		0	
XpTCGC	580	His+Lys	0		0	
XpATCGC	260	Lys	380	Lys	95	
XpAATCGC	670	Lys	350	Lys	1 400	His
XpAAATCGC	290		670	Lys	18 000	His

* α-субъединица не метится; ** X — остаток N-метилимидазола, подчеркнуты остатки рибозитидина.

степень мечения невелика — выходы, судя по удельным радиоактивностям, не превышают нескольких процентов. В таблице приведены также результаты идентификации точек аффинного мечения, т. е. тех аминокислотных остатков, к которым присоединены 5'-фосфамидной связью радиоактивные остатки -pN(pN), pN. Идентификацию осуществляли, как описано в работе [6], сравнивая кинетику убывания радиоактивности субъединиц аффинно-меченой РНК-полимеразы при гидролизе в средах с рН 4,8 с кинетикой гидролиза фосфамидной связи в модельных 5'-фосфамидах. Оказалось, что как в β-, так и в σ-субъединице наиболее эффективно метятся остатки гистидина. По-видимому, эти аминокислотные остатки в белке в условиях опытов (рН 7,8) в отличие от остатков лизина мало протонированы и поэтому лучше фосфорилируются.

Известно, что в ходе синтеза первых нескольких фосфодиэфирных связей происходит сильная конформационная перестройка РНК-полимеразы. На этой стадии, для которой было предложено название «стадия синтеза затравки», происходит постепенное упрочнение и повышение продуктивности тройного комплекса [матрица·фермент·продукт] [9], а на ее последнем этапе — после синтеза приблизительно девяти фосфодиэфирных связей — σ-субъединица диссоциирует в раствор [10]. Мы предполагаем, что подобные конформационные перестройки могут происходить и под действием олигонуклеотидов-затравок, имитирующих короткие синтезированные ферментом продукты [1], и что результаты аффинной модификации отражают эти перестройки. Так или иначе, как видно из представленных выше данных, использование аффинных реагентов — производных олигонуклеотидов-затравок — может дать ценную информацию о функциональной топографии РНК-полимеразы. Очевидно, что следующим этапом исследования должна стать локализация точек аффинной модификации на полипептидных цепях субъединиц.

Предложенная ранее методика фотоаффинной модификации [11], при которой на первом этапе фермент синтезировал радиоактивный фотоаффинный олигонуклеотид, а на втором этапе осуществлялось его фотоприсоединение к белку, не обеспечивала той селективности, которая характерна для использованного здесь подхода. Менее однозначна и «химическая» селективность фотореакционноспособных групп. Поэтому полученные ранее результаты фотоаффинной модификации [11—14] трудно сравнивать с полученными здесь данными. Можно лишь отметить, что главными мишенями аффинного мечения, как и в настоящей работе, были β- и σ-субъединицы и что с увеличением длины олигонуклеотидов сильно менялись эффективность мечения и распределение фотоаффинной метки между субъединицами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grachev M. A., Zaychikov E. F., Ivanova E. M., Komarova N. I., Kut'yavin I. V., Sidelnikova N. P., Frolova I. P. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 22, p. 8509-8524.
2. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 516-521.
3. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Биооргани. химия, 1986, т. 12, № 4, с. 475-481.
4. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Оникиенко А. И., Плетнев А. Г., Мигина Ю. Л. Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 6, с. 840-846.
5. Смирнов Ю. В., Липкин В. М., Овчинников Ю. А., Грачев М. А., Мустаев А. А. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 7, с. 1113-1116.
6. Grachev M. A., Mustaev A. A. FEBS Lett., 1982, v. 137, № 1, p. 89-94.
7. Roehling H. M., Neuhoff V. Electrophoresis, 1980, v. 1, № 1, p. 90-102.
8. Loemmler U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
9. Grachev M. A., Zaychikov E. F. FEBS Lett., 1980, v. 115, № 1, p. 23-26.
10. Hansen U., McClure W. R. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 20, p. 9564-9570.
11. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчикова Е. Ф., Плетнев А. Г. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1278-1280.
12. Свердлов Е. Д., Царев С. А. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1110-1113.
13. Grachev M. A., Zaychikov E. F. FEBS Lett., 1981, v. 130, № 1, p. 23-26.
14. Hanna M. M., Meares C. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 14, p. 4238-4242.

Поступило в редакцию
12.VI.1986

AFFINITY MODIFICATION OF *E. COLI* RNA POLYMERASE IN A COMPLEX WITH A PROMOTER BY PHOSPHORYLATING DERIVATIVES OF PRIMER OLIGONUCLEOTIDES

GRACHEV M. A., ZAYCHIKOV E. F., KUTYAVIN I. V., TSAREV I. G.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of USSR*

Oligonucleotides 2 to 7 nucleotide residues long, complementary to the codogenic strand of T7 promoter A2, have been synthesized; all of them contained a ribo-unit at the 3'-end. They were converted into 5'-(N-methyl)phosphoimidazolides, and the affinity reagents obtained were allowed to bind covalently to RNA polymerase in the presence of a promoter. Some of the nucleotide residues covalently attached occupied proper positions relative to the active centre of the phosphodiester bond synthesis and on addition of [α - 32 P]UTP were elongated, so that highly selective affinity labelling occurred. With oligonucleotides of various lengths, different distribution of the label between β , β' and σ subunits of RNA polymerase took place. Most efficient was labelling of β -subunit by the residue -pCpGpCpU, and of σ -subunit by the residue -pApApApTpCpGpCpU (p^* - radioactive phosphorus atom). In both cases, the amino acid residues labelled were histidines.