



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.277\*6.01:577.112.4

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОСТАТКА ГИСТИДИНА  
В ОБЛАСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ИНИЦИИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА  
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*

Грачев М. А., Лухтанов Е. А., Мустаев А. А.,  
Абдукаюмов М. Н.\*, Рабинов Н. В.\*, Рихтер В. А.\*,  
Скоблов Ю. С.\*

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР;

\* Институт ядерной физики Академии наук УзССР, Ташкент

Ранее нами было осуществлено высокоселективное аффинное мечение остатка гистидина РНК-полимеразы *E. coli* в присутствии промотора,  $\beta$ -имидазолида GDP и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$  [1]. В этой же работе был предложен метод быстрой локализации точки аффинного мечения на полипептидной цепи. Последующие исследования потребовали усовершенствования метода локализации и привели к уточнению положения аффинно меченного аминокислотного остатка, которым оказался не His<sup>1116</sup>, как указано в работе [1], а His<sup>1237</sup>. Ниже описаны соответствующие эксперименты и их результаты.

$\beta$ -Имидазолид GDP добавляли к комплексу РНК-полимеразы ( $4 \cdot 10^{-7}$  М) с фрагментом ДНК фага T7, содержащим промоторы A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> ( $10^{-7}$  М), в растворе состава: 40 мМ трис-HCl (pH 7,9), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ рифампицин. После инкубации в течение 1 ч при 37° С в смесь вводили  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$  ( $10^{-6}$  М, 3000 Ки/ммоль) либо  $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{UTP}$  в той же концентрации (1000 Ки/ммоль), полученный аналогично [2] из  $[\text{}^{33}\text{P}]\text{ортофосфорной кислоты}$  [3]. При этом происходило сверхселективное аффинное мечение РНК-полимеразы по остатку гистидина  $\beta$ -субъединицы [1].

Для локализации точки аффинного мечения полипептидной цепи  $\beta$ -субъединицы, последовательность аминокислот которой известна [4], мы воспользовались модифицированным методом [1], основанным на оценке «образа» распределения длин продуктов неполного расщепления полимера. Важным условием в данном случае является малая глубина расщепления, такая, чтобы на молекулу  $\beta$ -субъединицы в среднем приходилось менее одного разрыва. При соблюдении этого условия каждый образующийся радиоактивный пептид содержит либо N-, либо C-конец исходного полипептида. Очевидно, что искомая точка аффинного мечения расположена между N-концом кратчайшего радиоактивного C-концевого пептида и C-концом кратчайшего радиоактивного N-концевого пептида.

После аффинного мечения фермент денатурировали, добавляя додецилсульфат натрия до концентрации 1%, и выдерживали смесь в течение 1 ч при 37° С. Затем проводили частичное расщепление по метионинам при 20° С, добавляя 1/10 объема смеси 0,5 М BrCN и 0,5 М HCl. Реакцию останавливали добавлением 1/3 объема смеси, содержащей 0,5 М триэтанолламин, 5% меркаптоэтанол и 0,01% бромфеноловый синий, в 50% глицерине. Разделение продуктов деградации осуществляли гель-электрофорезом по Лэмбли [5]. Из картины электрофореза (рис. 1а) очевидно, что точка аффинного мечения резко сдвинута к одному из концов молекулы  $\beta$ -субъединицы. При сопоставлении схемы той же электрофореграммы и

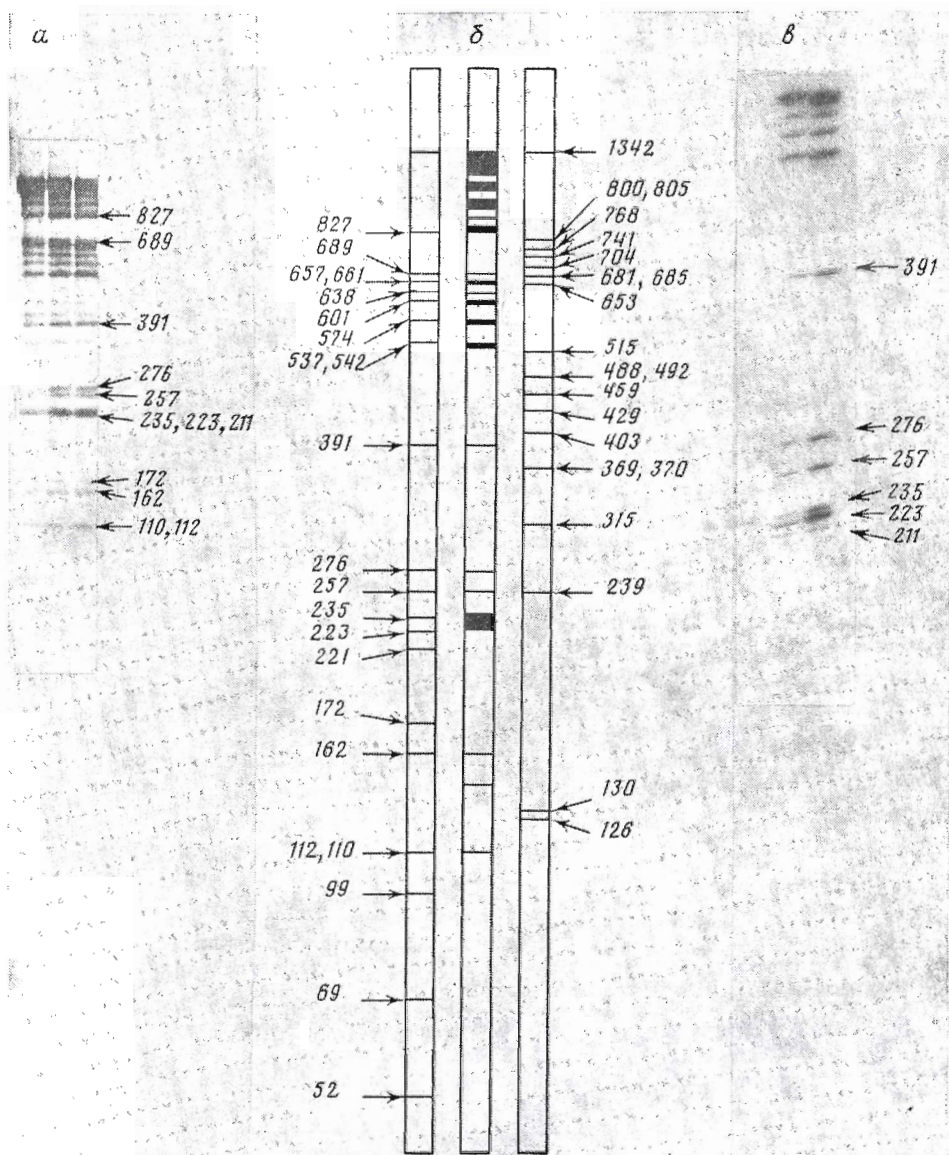


Рис. 1. Результаты ограниченного статистического расщепления аффинно меченой РНК-полимеразы: *a* – мечение комбинацией  $\beta$ -имидазолида GDP и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ ; 2, 5 и 10 мин инкубации с бромцианом (градиент ПААГ 10–20%, 10 см); *б* – схема той же электрофореграммы (в середине), справа и слева – расчетные электрофореграммы в предположении, что точка аффинного мечения находится вблизи соответственно С- и N-концов; *в* – то же самое, что и в «*a*», но мечение с использованием  $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{UTP}$  и разделение в 13% ПААГ, 25 см (приведена часть электрофореграммы). Цифры показывают длину пептида (число аминокислотных остатков)

расчетных электрофореграмм, построенных в предположении, что меченым является С-конец  $\beta$ -субъединицы (левая фореграмма) или N-конец (правая фореграмма) (рис. 1б), видно, что на большом протяжении картина распределения длин радиоактивных пептидов совпадает с теоретической для С-концевой метки. Таким образом, точка аффинного мечения расположена вблизи С-конца  $\beta$ -субъединицы.

В работе [1] утверждалось, что кратчайшим радиоактивным пептидом является фрагмент длиной 235 аминокислотных остатков, что и послужило основанием считать точкой аффинной модификации остаток His<sup>110</sup>. К этому неверному выводу привели два обстоятельства: 1) оказалось, что в области пептидов длиной 235, 223 и 211 аминокислотных остатков, соответствующих расщеплению по Met<sup>107</sup>, Met<sup>119</sup> и Met<sup>121</sup>, наблюдается «компрессия» (эти три пептида имеют близкую подвижность); 2) более

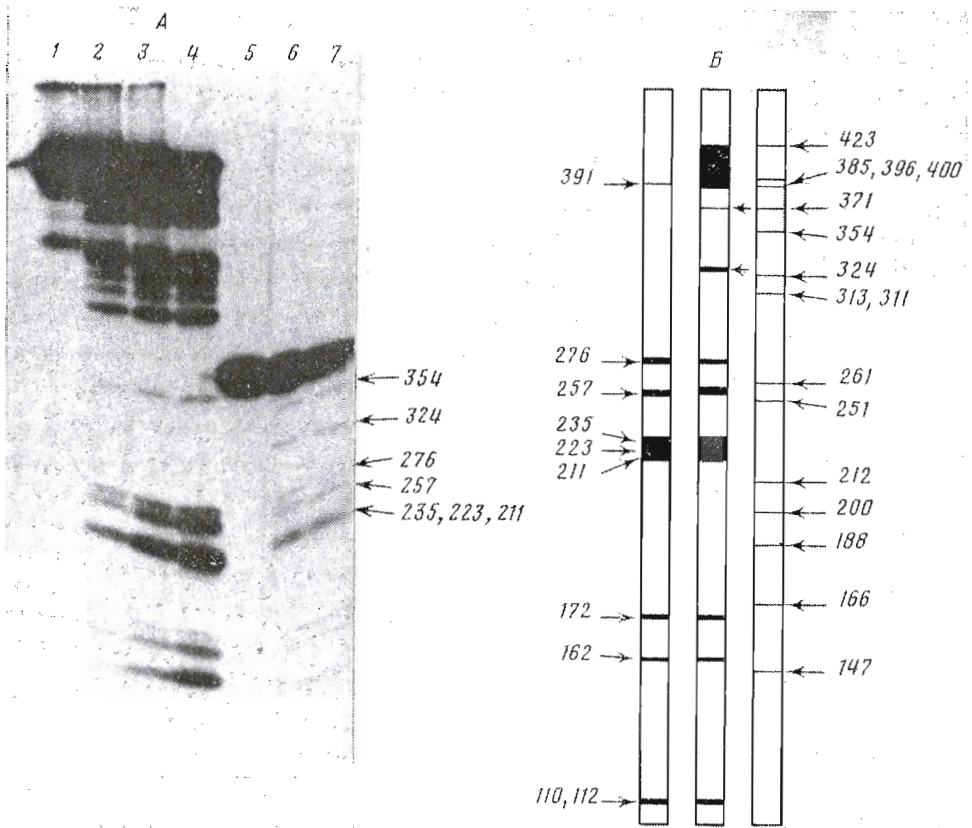


Рис. 2. Результаты ограниченного статистического расщепления аффинно меченной  $\beta$ -субъединицы (0 (1), 2 (2), 5 (3) и 10 (4) мин обработки бромцианом) и ее триптического фрагмента (обработка бромцианом в течение 2 (5), 5 (6), 10 (7) мин). а — электрофорез в условиях рис. 1а; б — схемы электрофореграммы ограниченного бромцианового расщепления триптического фрагмента (в середине), части расчетной электрофореграммы, взятой из рис. 1б (слева) и расчетной электрофореграммы в предположении, что точка аффинного мечения находится вблизи N-конца триптического фрагмента (справа)

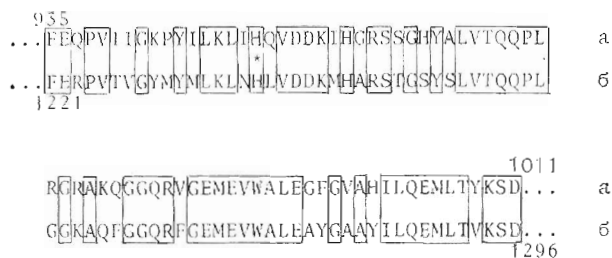


Рис. 3. Строение гомологичных участков РНК-полимераз из хлоропластов табака (а) и *E. coli* (б). В рамку заключены полностью совпадающие последовательности аминокислот, звездочкой отмечен аффинно модифицируемый остаток His<sup>1237</sup>  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*

короткие радиоактивные пептиды, имеющие аномально высокую подвижность, вышли за пределы геля и не были зарегистрированы. Как видно из рис. 1а, б, на электрофореграмме обнаруживаются радиоактивные пептиды с длинами 172, 162, 110 и 112 остатков (Met<sup>170</sup>, Met<sup>1180</sup>, Met<sup>1230</sup> и Met<sup>1232</sup>). Компрессию полос пептидов с длинами 235, 223 и 211 остатков удалось разрешить путем использования более длинного геля и [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (рис. 1в). Полученные данные позволили предположить, что кратчайший C-концевой радиоактивный пептид имеет длину либо 110, либо 112 остатков аминокислот, т. е. что меченый гистидин находится на участке между Met<sup>1232</sup> и Met<sup>1243</sup>, во всяком случае правее остатка Met<sup>1232</sup>.

Для уточнения локализации нужно было идентифицировать кратчайший N-концевой радиоактивный пептид. Решить эту задачу путем анализа картины распределения длин радиоактивных пептидов, полученных из целой  $\beta$ -субъединицы (рис. 1), не представлялось возможным из-за недостаточного разрешения в области длинных пептидов. Чтобы обойти это затруднение, мы провели расщепление в два этапа: сначала был выделен радиоактивный продукт неполного трипсинолиза длиной 423 аминокислотных остатка\*, а затем его подвергли частичному бромциановому расщеплению (рис. 2а). На рис. 2б показана схема электрофореграммы, приведенной на рис. 2а (слева) и теоретическая электрофореграмма (справа), построенная исходя из предположения, что должны присутствовать все зарегистрированные радиоактивные C-концевые пептиды (рис. 1а), а также все возможные, содержащие N-конец трипсинового фрагмента продукты расщепления по остаткам метионина. На электрофореграмме отчетливо видны две радиоактивные полосы, отсутствующие в гидролизате интактной  $\beta$ -субъединицы. Верхняя из двух отмеченных стрелками полос, очевидно, принадлежит пептиду с длиной 354 остатка, нижняя — пептидам с длиной 324 либо, что менее вероятно, 311 или 313 остатков. Таким образом, точка аффинной модификации находится левее остатка Met<sup>1213</sup> (1342—423+324=1243). Остается участок Met<sup>1232</sup>—Met<sup>1243</sup>, где имеется всего один остаток гистидина — His<sup>1237</sup>.

Интересно, что именно в этом районе расположена область наиболее сильной гомологии  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* и соответствующей субъединицы РНК-полимеразы из хлоропластов табака [6] (рис. 3). При общей гомологии РНК-полимераз, составляющей 39%, аминокислотные последовательности этих участков совпадают на 80%. Очевидно, что эта область, так же как и область 1040—1065  $\beta$ -субъединицы, где находится входящий в состав активного центра остаток лизина [7], является жизненно важной для функционирования этих ферментов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Грачев М. А., Колочева Т. И., Мустаев А. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 3. С. 723—727.
2. Walselt T. E., Johnson R. A. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 526. № 1. P. 11—31.
3. Левин В. И. // Получение радиоактивных изотопов. М.: Атомиздат, 1973. С. 129—130.
4. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Chertov O. Y., Modyanov N. N., Makarova I. A., Marchenko T. V., Polonnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdllov E. D. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 116. № 3. P. 624—629.
5. Iacmml U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
6. Ohme M., Tanaka M., Chunwongse J., Shinozaki K., Sugiura M. // FEBS Lett. 1986. V. 200. № 1. P. 87—90.
7. Грачев М. А., Лухтанов Е. А., Мустаев А. А., Рихтер В. А., Рабинов И. В., Скоблов Ю. С., Абдукаюмов М. И. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 552—555.

Поступило в редакцию 12.XII.1986

#### LOCALIZATION OF A HISTIDINE RESIDUE IN THE INITIATING SUBSTRATE BINDING CENTRE OF *E. COLI* RNA POLYMERASE GRACHEV M. A., LUKHTANOV E. A., MUSTAEV A. A., ABDUKAYUMOV M. N. S., RABINOV I. V. S., RICHTER V. A. S., SKOBL'OV Yu. S. S.\*

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

\*Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences  
of the Uzbek. SSR, Tashkent

*E. coli* RNA polymerase was selectively labelled in the presence of promoters at a histidine residue of the  $\beta$ -subunit by treatment with GDP  $\beta$ -imidazolide and then with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (or [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]UTP). Partial cyanogen bromide cleavage of the labelled polypeptide afforded a series of «single-hit» labelled peptides, the electrophoretic pattern of which suggested that the labelling site was His<sup>1237</sup>. This conclusion was confirmed by a similar pattern obtained with products of the cyanogen bromide cleavage of a radioactive peptide obtained by the limited trypsinolysis (C-terminal peptide consisting of 423 amino acid residues). Interpretation of our earlier results in favour of His<sup>1116</sup> as the labelling point (Dokl. Acad. nauk SSSR, 1985, v. 281, p. 723) was incorrect due to the electrophoretic «compression» of three labelled peptide bands.

\* Местоположение точки расщепления определяли сравнением длины триптического фрагмента с длиной других пептидов — продуктов ограниченного бромцианового расщепления, а также используя данные о специфичности трипсина и аминокислотной последовательности соответствующего участка полипептидной цепи.