



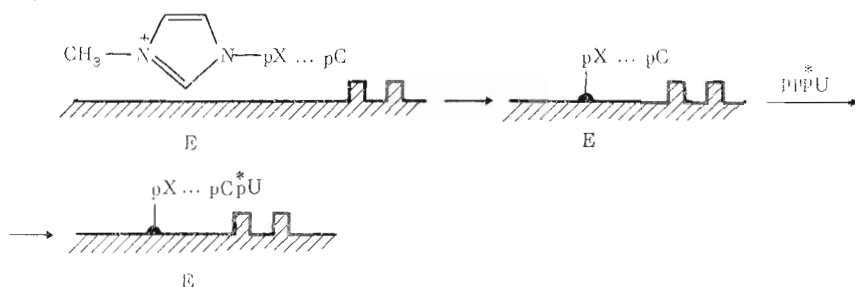
УДК 577.152.277'145 : 577.112.4

ИЗУЧЕНИЕ ЭЛОНГАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, КОВАЛЕНТНО ФИКСИРОВАННЫХ В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

Зайчиков Е. Ф., Царев Н. Г.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

В нашей недавней работе [1] для исследования топографии транскрипционного комплекса на начальных этапах синтеза РНК методом высоко-селективного аффинного мечения [2, 3] были использованы N-метилимидазолиды олигонуклеотидов, комплементарных промоторному участку A2 фага T7 и являющихся затравками при синтезе РНК с этого промотора [4]. При этом сначала проводили модификацию двойного комплекса [РНК-полимераза — промотор] нерадиоактивным имидазолидом олигонуклеотида, а затем олигонуклеотид, ковалентно связавшийся в активном центре, наращивали на одно звено, добавляя в смесь радиоактивный субстрат:



В данной работе исследована возможность элонгации ковалентно фиксированных таким образом в активном центре олигонуклеотидов.

Для этого 5'-N-метилимидазолид гептануклеотида AAATCGrC (10^{-4} M; получен как описано в работе [5]) инкубировали 40 мин с РНК-полимеразой ($5 \cdot 10^{-7}$ M) и промоторным фрагментом [6] ($5 \cdot 10^{-7}$ M) в 20 мкл 25 mM NEPPS (pH 7,8) — 10 mM MgCl₂ — 50 mM NaCl, затем 3 мин с 10^{-4} M рифампицином и, наконец, 2 мин с $5 \cdot 10^{-7}$ M [α -³²P]UTP (2000 Ки/ммоль, хроматографически очищен от примеси АТР). Полученный таким образом транскрипционный комплекс, содержащий остаток меченого олигонуклеотида AAATCGr(CU^{*}), инкубировали (1 ч при 37° C) с различными комбинациями нерадиоактивных NTP (10^{-3} M). Оказалось (рис. 1а), что в результате такой инкубации электрофоретическая подвижность меченой σ -субъединицы уменьшается, причем этот эффект тем больше выражен, чем больше различных субстратов было в смеси при элонгации. Можно полагать, что наблюдаемое «утяжеление» σ -субъединицы связано с удлинением ковалентно присоединенного к ней олигонуклеотида. Чтобы подтвердить это предположение, фрагмент геля (рис. 1а), содержащий модифицированную σ -субъединицу, обрабатывали 10% HCOOH (1,5 ч при 37° C) и после отделения водной фазы проводили осаждение 10-кратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне. Олигонуклеотиды, отщепленные в результате этого от σ -субъединицы, были проанализированы гель-электрофорезом (рис. 1б). Оказалось, что длины отщепленных

Сокращения: SDS — додецилсульфат натрия, NEPPS — 4-(2-гидроксиптил)-1-пиперазинпропансульфоновая кислота. В дезокси-нуклеотидных последовательностях префикс «d» опущен; звездочкой отмечен [5'-³²P]нуклеотид.

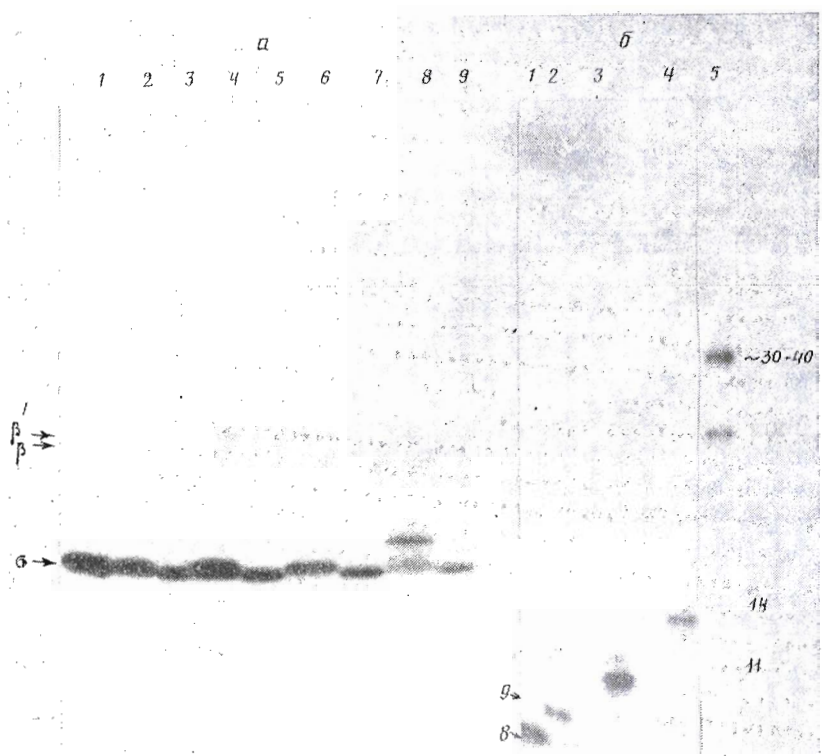
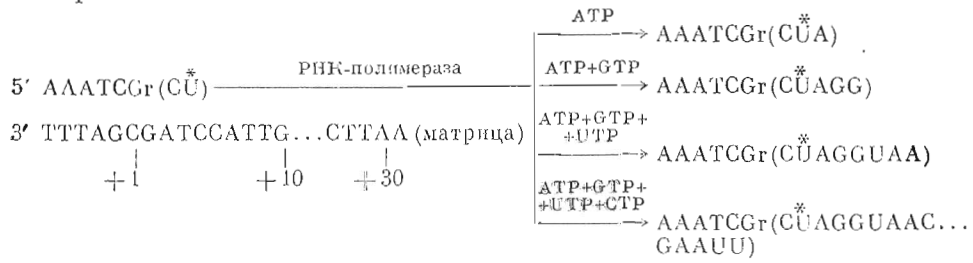


Рис. 1. Элонгация остатка АААТСГг(CU^{*}), ковалентно фиксированного в активном центре РНК-полимеразы. *а* – электрофорез по Лэммли [7] реакционных смесей до элонгации (дорожка 1) и после элонгации в присутствии АТФ (2, 3), АТФ+GTP (4, 5), АТФ+GTP+УТР (6, 7) и АТФ+GTP+УТР+СТР (8, 9). Перед нанесением на гель пробы денатурировали прогреванием с SDS и меркаптоэтанолом как описано в работе [1]: пробы, соответствующие дорожкам 3, 5, 7 и 9, перед денатурацией обрабатывали РНКазой А (100 мкг/мл, 37°С, 20 мин). Разделяющий гель содержал градиент полиакриламида от 5 до 12%; *б* – электрофорез продуктов демодификации σ -субъединицы в 25% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. Дорожки 1, 2, 3, 4 и 5 соответствуют σ -субъединицам дорожек 1, 2, 4, 6 и 8 рис. 1а. Цифры слева и справа здесь и на рис. 2 обозначают длины олигонуклеотидов, определенные путем сравнения с олигонуклеотидными маркерами

олигонуклеотидов соответствуют длинам продуктов элонгации октануклеотида АААТСГг(CU^{*}), ожидаемых на основании первичной структуры промотора А2:



Кроме того, из сравнения рис. 1а и 1б видно, что степень «утяжеления» σ -субъединицы коррелирует с длиной продукта элонгации ковалентно присоединенного олигонуклеотида: при удлинении на 1, 3 или 6 звеньев оно незначительно (рис. 1а, 2, 4, 6), но становится существенным при удлинении на ~30 звеньев (рис. 1а, 8). После обработки РНКазой «утяжеленная» σ -субъединица приобретает прежнюю подвижность (рис. 1а, 3, 5, 7 и 9).

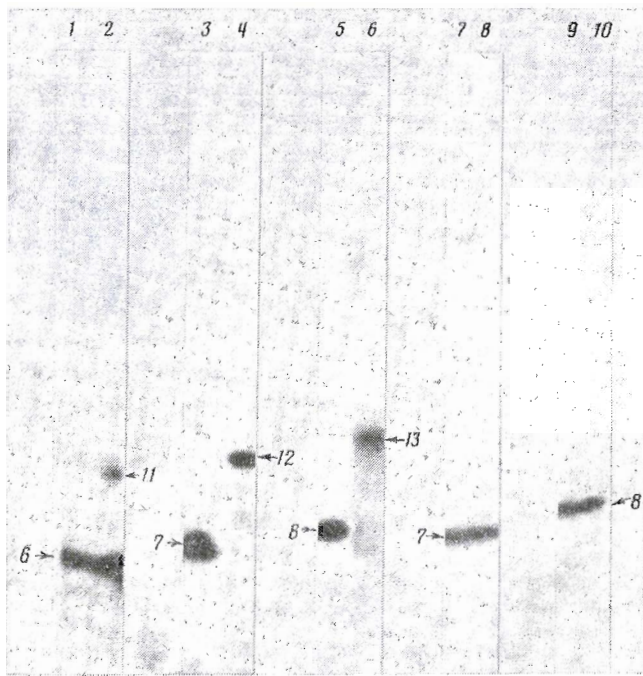


Рис. 2. Результаты анализа олигонуклеотидов, отщепленных от σ - (1-6) и β -субъединицы (7-10), меченных метилимидазолидами олигонуклеотидов АТСGrС (1, 2), ААТСGrС (3, 4, 7, 8) или АААТСGrС (5, 6, 9, 10) в сочетании с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, до (1, 3, 5, 7 и 9) и после (2, 4, 6, 8 и 10) элонгации (10 мин, 37°C) в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М АТР+GТР+UTP. Электрофорез проводили в 25% полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины

Из результатов анализа олигонуклеотидов, отщепленных от σ -субъединицы (рис. 2), видно, что элонгироваться способны остатки не только октануклеотида, но также гепта- и гексануклеотида (хотя в последнем случае эффективность элонгации существенно ниже). В то же время ни гептануклеотид ААТСGr(CU), ни октануклеотид АААТСGr(CU), ковалентно фиксированные на β -субъединице, при инкубации с тремя нерадиоактивными NTP в тех же условиях не удлиняются (рис. 2, 7-10).

Очевидно, что необходимым условием элонгации олигонуклеотида, находящегося в активном центре РНК-полимеразы, является возможность смещения (транслокации) каталитического центра фермента относительно матрицы и продукта. Если 5'-конец олигонуклеотида ковалентно фиксирован на ферменте, то такая транслокация должна быть затруднена, поскольку в этом случае для ее осуществления необходимы сильные деформации пространственной структуры либо олигонуклеотида, либо фермента. Такого рода деформации происходят, в частности, при синтезе полифенилаланина, иницируемом остатком фергилаланил-тРНК, ковалентно фиксированным на рибосоме, и заключаются в образовании синтезируемым полипептидом «петлеобразной» структуры [8]. Однако в нашем случае такая возможность представляется маловероятной из-за гораздо более жесткой привязки субстрата к белку. В то же время известно, что σ -субъединица диссоциирует от минимального фермента после того, как продукт достигает длины 8-9 нуклеотидных остатков [9, 10]. Поэтому мы считаем, что способность олигонуклеотидов длиной 6-8 звеньев элонгироваться (принимая во внимание неспособность к элонгации этих же олигонуклеотидов, фиксированных на β -субъединице — см. рис. 2) следует интерпретировать как свидетельство ослабления взаимодействия σ -субъединицы с минимальным ферментом, которое предшествует окончательной ее диссоциации. Можно также предположить, что непосредственное взаимодействие 5'-конца транскрипта длиной 6-7 нуклеотидов с

σ -субъединицей и приводит к выталкиванию последней из транскрипционного комплекса при последующих актах элонгации.

Нам представляется также, что поэтапное удлинение олигонуклеотидов, ковалентно фиксированных вблизи активного центра РНК-полимеразы, может оказаться удобным приемом для изучения динамики превращений в транскрипционном комплексе на «стадии синтеза затравки» [4], в частности динамики диссоциации σ -субъединицы.

Авторы выражают благодарность М. А. Грачеву за интерес к работе и ее поддержку, а также И. В. Рабинову (ИЯФ АН УзССР) за очистку препарата [α - 32 P]УТР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кутявин И. В., Царев И. Г. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1678–1681.
2. Grachev M. A., Mustaev A. A. // FEBS Lett. 1982. V. 137. № 1. P. 89–94.
3. Grachev M. A., Kolocheva T. I., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 113–121.
4. Grachev M. A., Zaychikov E. F., Ivanova E. M., Komarova N. I., Kutuyavin I. V., Sidelnikova N. P., Frolova I. P. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 22. P. 8509–8524.
5. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475–481.
6. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Онищенко А. И., Платнев А. Г., Митина Ю. Л. // Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 840–846.
7. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
8. Будкер В. Г., Гиршович А. С., Скобельцына Л. М. // Докл. АН СССР. 1972. Т. 207. № 1. С. 215–217.
9. Hansen U., McClure W. R. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 20. P. 9564–9570.
10. Straney D. C., Crothers D. M. // Cell. 1985. V. 43. № 2. P. 449–459.

Поступило в редакцию
27.IV.1987

После доработки
1.VI.1987

STUDIES OF THE ELONGATION OF OLIGONUCLEOTIDE RESIDUES FIXED COVALENTLY IN THE ACTIVE SITE OF RNA POLYMERASE

ZAYCHIKOV E. F., TSAREV I. G.

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

Elongation (mediated by RNA polymerase and NTPs) of the primer oligonucleotide residues, covalently fixed near the active centre of RNA polymerase, has been studied. Hepta- and octanucleotide residues covalently attached to β -subunit could not be elongated (evidently, because the translocation step is prevented), whereas the same residues attached to σ -subunit were easily elongated. It was concluded that ease of the oligonucleotide residue elongation is due to the dissociation of σ -subunit from the transcription complex. The mechanism of this dissociation is discussed.