



УДК 577.152.277

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОСТАТКА ЛИЗИНА В ОБЛАСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ИНИЦИИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА Т7

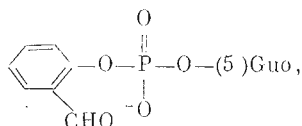
Максимова Т. Г., Мустаев А. А., Зайчиков Е. Ф.,
Баранова Л. В., Кумарев В. П., Лухманов Е. А.

Цитологический институт СО Академии наук СССР, Иркутск

Осуществлено высокоселективное аффинное мечение остатка лизина вблизи активного центра РНК-полимеразы бактериофага Т7. Аффинную метку вводили с помощью орто-формилфенилового эфира GMP и [α - 32 P]УТР, используя двухстадийную процедуру. После расщепления белка гидроксиламином аффинная метка была обнаружена во фрагменте Gly⁵⁸⁹—Ala⁸⁸³. Анализ картин расщепления этого фрагмента бромом, бромсукцинимидом и бромцианом привел к выводу об аффинном мечении остатка Lys⁶³¹. Оказалось также, что участок вблизи этого остатка лизина имеет высокую степень гомологии с участками РНК-полимераз фагов Т3, SP6 и митохондрий дрожжей.

РНК-полимераза бактериофага Т7 представляет собой один из наиболее просто устроенных ферментов транскрипции. В ее состав входит единственная субъединица размером 883 аминокислотных остатка с известной первичной структурой [1, 2]. Для этого фермента пока практически нет данных о топографии активного центра. Ранее нами [3], а затем и другими авторами [4] было осуществлено высокоселективное аффинное мечение активного центра РНК-полимеразы фага Т7 с использованием аналогов пуриновых нуклеотидов. В настоящем сообщении описаны результаты идентификации остатка лизина, подвергающегося аффинному мечению.

В качестве аффинного реагента в данной работе использован орто-формилфениловый эфир



синтезированный как описано в работе [5]. Преимущество этого реагента по сравнению с использованными в работах [3, 4] состоит в том, что его альдегидная группа находится очень близко от фосфатного остатка и поэтому способна образовывать основание Шиффа с остатком лизина, непосредственно вовлеченным в связывание α -фосфата иницирующего субстрата. Мечение проводили согласно двухстадийной схеме [6], обеспечивающей высокоселективное введение радиоактивной аффинной метки в область активного центра РНК-полимеразы.

В качестве матрицы использовали химически синтезированный (как описано в работе [7]) фрагмент двухспиральной ДНК длиной 60 п. о., содержащий каноническую последовательность промоторов класса III фага Т7, но имеющий замену $\begin{pmatrix} \text{G} \\ \text{C} \end{pmatrix} \rightarrow \begin{pmatrix} \text{G} \\ \text{A} \end{pmatrix}$ в положении +2 относительно точки инициации:

ТТААТСАТТГТСГАААТТААТАСГАСТСАСТАТАГТГАГАГАСААСТТТАААГАГАСТТАА
ААТТАГТААСАСТТТААТТАТГСТГАТГАТАТСАСТСТСТГТТГААТТТСТСТГААТТ

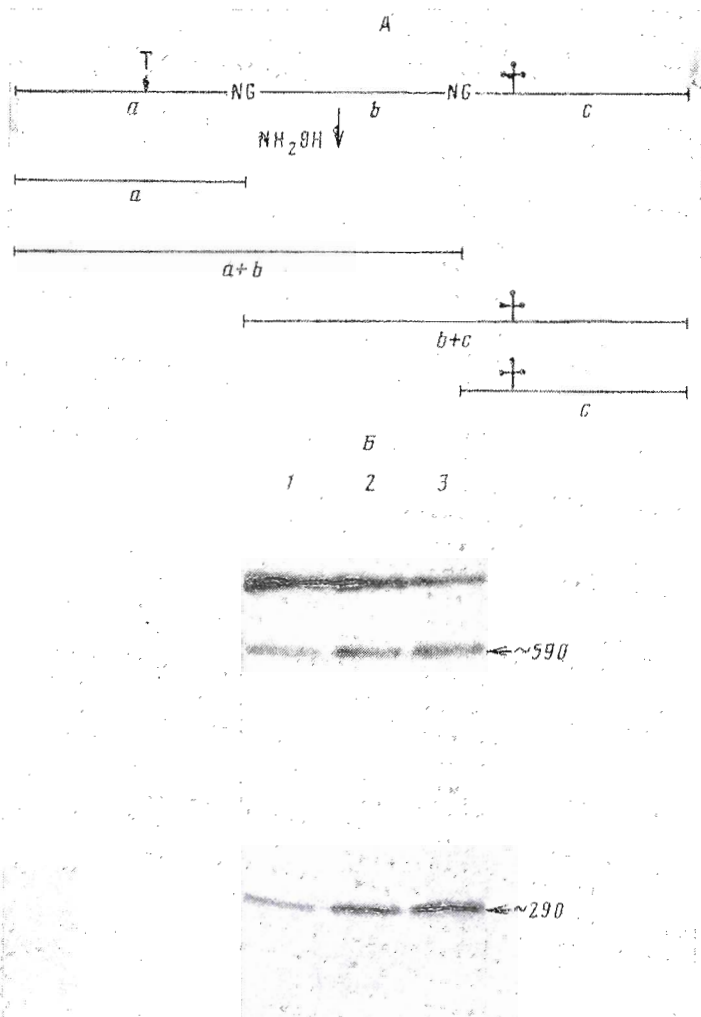


Рис. 1. Результаты локализации аффинной метки на продуктах расщепления РНК-полимеразы фага Т7 гидроксиламиноом. А — схема расщепления РНК-полимеразы фага Т7 гидроксиламиноом. Указаны места расщепления гидроксиламиноом (NG), трипсином (Т) и местоположение аффинной метки (†), найденное в настоящей работе. В — результаты анализа продуктов расщепления гидроксиламиноом диск-электрофорезом в 10%-вом ПААГ. Дорожки 1, 2 и 3 — 2, 4 и 9 ч инкубации с гидроксиламиноом

Такая замена позволила при использовании в качестве радиоактивного субстрата на второй стадии мечения $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ ограничить элонгацию ковалентно присоединенного остатка аффинного реагента одним нуклеотидным звеном (в предварительных экспериментах с природным промотором и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ в результате неограниченной элонгации ковалентно присоединенная аффинная метка представляла собой неомогенный набор олигонуклеотидов длиной до 10 звеньев, что в дальнейшем мешало локализации). Матричная эффективность такого измененного промотора оказалась даже несколько выше, чем у природного.

Для локализации точки аффинного мечения использовали подход, основанный на ограниченном одноударном расщеплении меченого белка по определенным аминокислотным остаткам или последовательностям [5, 8]. Известно, что гидроксиламин при рН 9–10 расщепляет пептидные связи между остатками аспарагина и глицина [9]. В полипептидной цепи

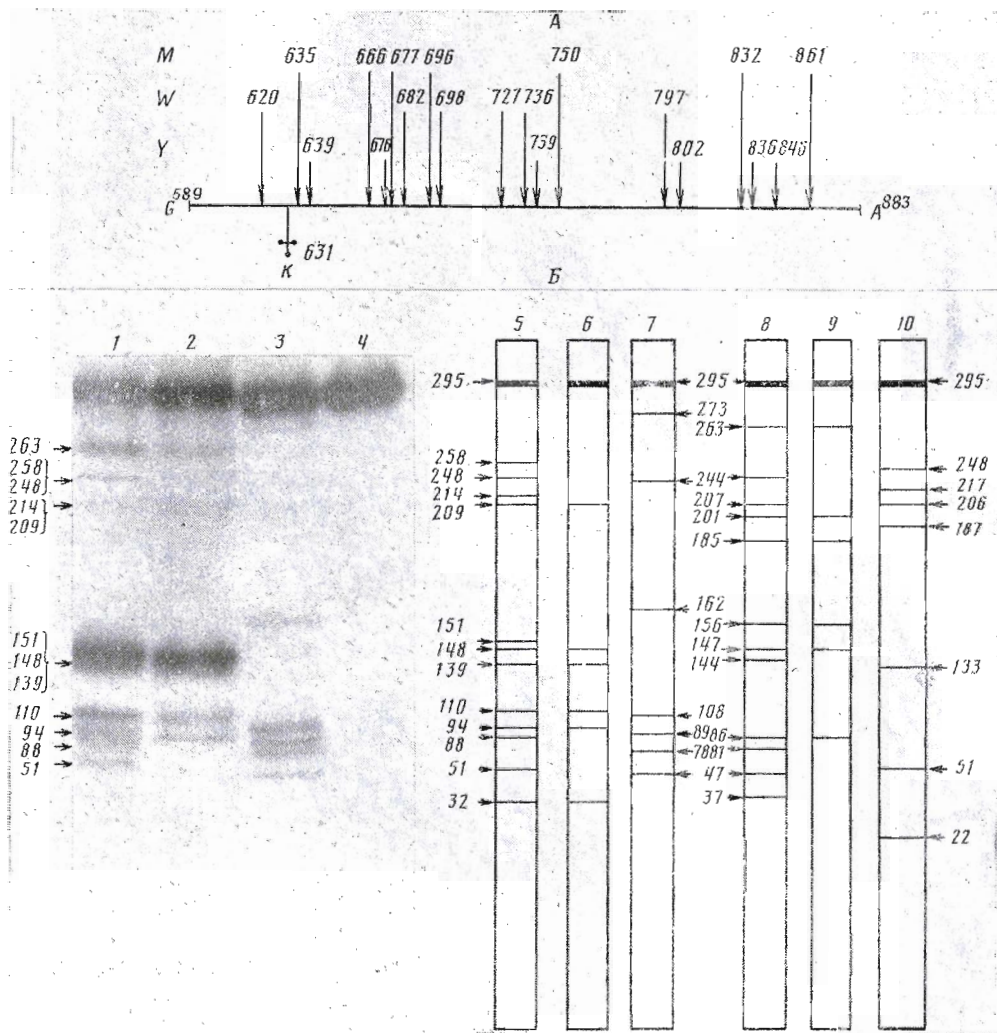
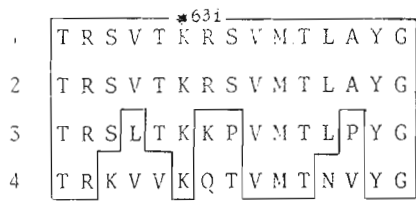


Рис. 2. Результаты локализации аффинной метки на продуктах расщепления фрагмента *c*. А — схема расположения остатков триптофана (W), тирозина (Y) и метионина (M) на полипептидной цепи фрагмента *c*; † — аффинная метка, местоположение которой определено в настоящей работе. Б — результаты электрофоретического анализа продуктов расщепления бромом (1), N-хлорсукцинимидом (2) или бромцианом (3). Электрофорез вели в градиентном (10–20%) полиакриламидном геле. Дорожка 4 — изображение «одноударных» пептидов для расщепления по Trp + Trp, Trp и Met соответственно, вычисленные на основании известного расположения этих остатков в полипептидной цепи фрагмента *c* (см. рис. 2А); дорожки 8–10 — соответствующие теоретические картины электрофореза для «одноударных» пептидов С-концевой цепи

РНК-полимеразы фага Т7 имеются две такие дипептидные последовательности: Asn²⁸⁹ — Gly²⁹⁰ и Asn⁵⁸⁸ — Gly⁵⁸⁹. Следовательно, при ограниченном одноударном расщеплении РНК-полимеразы фага Т7 гидроксилламином следует ожидать образования продуктов длиной 594, 588, 294 и 289 аминокислотных остатков (рис. 1А). Как видно из рис. 1Б, радиоактивную метку содержат два продукта расщепления длиной приблизительно 590 и 290 аминокислотных остатков. Наличие радиоактивной метки в малом фрагменте свидетельствует о том, что мечению подвергается одна из концевых третей полипептида (фрагменты *a* или *c*, рис. 1А). Обработка аффинно-меченного фермента трипсином в нативных условиях (при этом происходит расщепление на расстоянии приблизительно 170 аминокислотных остатков от N-конца полипептидной цепи РНК-полимеразы фага Т7 (10)) перед обработкой гидроксилламином не приводит к изменению подвижности продуктов гидроксилламинного расщепления (данные не приве-

Рис. 3. Участок, включающий остаток Lys^{631} РНК-полимеразы фага Т7 (1), а также гомологичные этому участку последовательности РНК-полимераз фагов ТЗ (2), SP6 (3), а также РНК-полимеразы митохондрий дрожжей (4). В рамки взяты гомологичные последовательности



дены). Из этого следует, что аффинная метка содержится в С-концевой трети полипептида (фрагмент *c*, рис. 1А).

Для более точного определения местоположения аффинной метки фрагмент *c* выделяли электрофорезом и подвергали ограниченному одноударному расщеплению по остаткам триптофана, тирозина и метионина (схема расположения этих остатков представлена на рис. 2А). В условиях одноударного расщепления следует ожидать образования двух серий продуктов, содержащих соответственно N- и С-концы исходного полипептида. При обработке N-хлорсукцинимидом, расщепляющим белки по остаткам триптофана [11], полученная экспериментально картина электрофоретического разделения радиоактивных продуктов (рис. 2Б, дорожка 2) сходна с теоретически ожидаемой картиной для серии N-концевых одноударных пептидов (рис. 2Б, дорожка 6) и отличается от таковой для С-концевых одноударных пептидов (рис. 2Б, дорожка 9). Из сравнения этих картин следует, что наименьший радиоактивный пептид имеет длину 94 аминокислотных остатка и, следовательно, является продуктом расщепления по Trp^{682} , содержащим N-конец фрагмента *c*. N-Концевого радиоактивного продукта расщепления по Trp^{620} длиной 31 звено не наблюдается, однако имеется С-концевой радиоактивный продукт расщепления по этому остатку длиной 263 звена (рис. 2Б, ср. дорожки 2 и 9). Из этого следует, что аффинная метка расположена между остатками Trp^{620} и Trp^{682} . На этом участке расположены три остатка лизина: Lys^{631} , Lys^{642} и Lys^{663} [1, 2].

Данные, полученные при ограниченном расщеплении фрагмента *c* с помощью брома (по остаткам $\text{Trp} + \text{Tyr}$ [12]) и бромциана (по остаткам Met [13]), позволили однозначно идентифицировать мишень мечения. Электрофоретические картины радиоактивных продуктов расщепления в этих случаях также сходны с соответствующими теоретическими картинками для N-концевых пептидов и отличаются от таковых для С-концевой серии (рис. 2Б, ср. дорожки 1, 3 с дорожками 5, 7 и 8, 10). При этом в обоих случаях имеются радиоактивные пептиды длиной около 50 звеньев, являющиеся, очевидно, продуктами расщепления соответственно по Tyr^{639} и Met^{635} (теоретические длины 51 и 47 звеньев), содержащими N-конец фрагмента *c*. Из этого следует, что аффинная метка расположена слева от Tyr^{639} и Met^{635} и может быть связана только с остатком Lys^{631} .

Известно, что РНК-полимераза фага Т7 имеет участки сильной гомологии с РНК-полимеразами фагов ТЗ, SP6, а также РНК-полимеразой из митохондрий дрожжей [14—16]. Остатки Lys^{642} и Lys^{663} находятся в областях очень слабой гомологии, в то время как остаток Lys^{631} расположен в одном из участков с наиболее явно выраженной гомологией, являясь при этом инвариантным (рис. 3). Это свидетельствует в пользу эволюционного родства митохондрий с фагами Т7, ТЗ и SP6, а также эволюционной консервативности структур, формирующих активный центр РНК-полимераз фагов и митохондрий (аналогичная консервативность активного центра уже отмечалась нами для активного центра РНК-полимераз из *E. coli*, хлоропластов табака и пшеницы [5, 8]).

Интересно также отметить, что ранее нами с помощью этого же аналога был идентифицирован остаток лизина в активном центре РНК-полимеразы *E. coli* [5]. Возможно, что активные центры и других РНК-полимераз содержат остатки лизина, необходимые для обеспечения электростатического контакта с α -фосфатом иницирующего субстрата.

Авторы выражают благодарность М. А. Подыминогину (НИБХ СО АН СССР) за предоставление и репарата РНК-полимеразы фага Т7, а также М. А. Грачеву за постоянный интерес к работе и полезные обсуждения.

Экспериментальная часть

РНК-полимераза бактериофага Т7, выделенная как описано в работе [17], представлена М. А. Подыминогиным. Промоторный фрагмент длиной 60 п. о. синтезирован как описано в работе [7]. орто-Формилфениловый эфир GMP получали как описано в работе [18].

Уридин-5'-[α - 32 P]трифосфат производства ИЯФ АН УзССР имел удельную радиоактивность 2000 Ки/ммоль. Перед использованием препарат радиоактивного УТР упаривали и растворяли в воде до концентрации 10^{-5} М.

В работе использовали додецилсульфат натрия, меркаптоэтанол, акриламид и N,N'-метиленисакриламид производства фирмы Serva (ФРГ); бромциан, N-хлорсукцинимид и трис производства фирмы Sigma (США). Все остальные реактивы — отечественного производства, имеющие квалификацию ос. ч. или х. ч.

Аффинное мечение РНК-полимеразы фага Т7. РНК-полимеразу (10^{-7} М) сначала инкубировали 5 мин с промоторным фрагментом (10^{-7} М) в растворе состава 40 мМ трис-НСl (рН 7,9) — 8 мМ MgCl₂ — 0,1 мМ дитиотрепт, затем добавляли орто-формилфениловый эфир GMP до концентрации 0,3 мМ и инкубировали 15 мин при 37° С. После этого проводили восстановление 10 мМ боргидридом натрия в течение 30 мин при 10° С. Для осуществления элонгации в смесь вводили [α - 32 P]УТР до концентрации 10^{-6} М и инкубировали 15 мин при 37° С.

Расщепление меченого фермента гидроксиламином. К раствору меченой РНК-полимеразы добавляли равный объем 2 М гидроксилamina в 0,2 М K₂CO₃ (рН 10) и инкубировали при 37° С. Аликвоты реакционной смеси анализировали диск-электрофорезом в 10% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия.

Расщепление фрагмента с N-хлорсукцинимидом, бромом и бромцианом. После электрофоретического разделения продуктов гидроксилaminового расщепления меченого белка полосу геля, содержащую фрагмент с (длиной около 260 п. о.), вырезали, измельчали, заливали двукратным (относительно объема геля) объемом воды и встряхивали 1 ч при 20° С. После центрифугирования и отбора водной фазы элюцию повторяли. Объединенные элюаты концентрировали (путем многократного встряхивания с n-бутанолом) до 50—100 мкл, бутанол удаляли эфиром, эфир отдували.

Выделенный таким образом фрагмент с подвергали обработке 10 мМ N-хлорсукцинимидом в 0,2 М формате аммония (рН 4) в течение 10 мин, или 1 мМ бромом в 0,2 М формате аммония (рН 4) в течение 5 мин, или 100 мМ бромцианом в 0,05 М HCl в течение 15 мин. Все процедуры расщепления проводили при 20° С. Реакции останавливали добавлением меркаптоэтанолола до 1% и триэтанолamina (рН 9,0) до 0,2 М. После денатурации в присутствии 1% додецилсульфата натрия в течение 30 мин при 37° С пробы анализировали диск-электрофорезом в градиентном (10—20%) полиакриламидном геле.³

ЛИТЕРАТУРА

1. Grachev M. A., Pletnev A. G. // FEBS Lett. 1981. V. 127. № 1. P. 53—56.
2. Stahl S. J., Zinn K. // J. Mol. Biol. 1981. V. 148. № 4. P. 481—485.
3. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Лукманов Е. А., Максимова Т. Г., Мустаев А. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 568—570.
4. Schäffner A. R., Jorgensen E. D., McAllister W. T., Hartmann G. R. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 21. P. 8773—8781.
5. Грачев М. А., Лукманов Е. А., Мустаев А. А., Рухтер В. А., Рабинов И. В., Скоблов Ю. С., Абдукаюмов М. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 552—555.
6. Grachev M. A., Kolocheva T. I., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 113—121.
7. Куларев В. И., Баранова Л. В., Коблес В. Ф., Кузнецов К. Д., Средин Ю. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 276—278.
8. Грачев М. А., Лукманов Е. А., Мустаев А. А., Абдукаюмов М. И., Рабинов И. В., Рухтер В. А., Скоблов Ю. С. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 7. С. 992—995.
9. Butler P. J., Parris J. J., Hartley V. S., Leberman R. // Biochem. J. 1967. V. 103. № 1. P. 78.
10. Tabor S., Richardson C. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 4. P. 1074—1078.
11. Han K. K., Richard C., Biserte G. // Int. J. Biochem. 1983. V. 15. № 7. P. 875—884.
12. Spande T. F., Witkop B., Degani Y., Palchornik A. // Adv. Protein. Chem. 1970. V. 24. P. 97—260.
13. Gross E., Witkop B. // J. Amer. Chem. Soc. 1961. V. 83. № 6. P. 1510—1511.
14. McGraw N. J., Bailey J. N., Cleaves G. R., Dembinski D. R., Cocke C. R., Joliffe L. K., MacWright R. S., McAllister W. T. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 18. P. 6753—6766.
15. Kolani H., Ishizaki Y., Hiraoka N., Obayashi A. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 6. P. 2653—2664.

16. Masters B. S., Stohl L. L., Clayton D. A. // Cell. 1987. V. 51. № 1. P. 89—99.
17. Davanloo P., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Studier F. W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 2035—2039.
18. Грачев М. А., Лукханов Е. А., Мустаев А. А., Рихтер В. А., Рабинов В. В., Скоблов Ю. С., Абдукаюмов М. Н. // Биорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 552—555.

Поступила в редакцию
30.V.1988

LOCALIZATION OF LYSINE RESIDUE NEARBY THE SITE
OF INITIATING SUBSTRATE BINDING OF T7
BACTERIOPHAGE RNA POLYMERASE

MAXIMOVA T. G., MUSTAEV A. A., ZAYCHIKOV E. F., BARANOVA L. V.,
KUMAREV V. P., LUKHTANOV E. A.

*Limnological Institute, Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR,
Irkutsk*

A highly selective affinity label was introduced into the T7 phage RNA polymerase by means of GMP *ortho*-formylphenyl ester and [α - 32 P]UTP nearby the enzyme's active site, which was located using limited cleavage technique. Hydroxylamine, bromine, N-chlorosuccinimide, and cyanogen bromide were employed as the reagents. Analysis of gel-electrophoretic patterns of the cleavage products led to a conclusion that Lys⁶³¹ is the target of labelling. The region nearby this residue has a high degree of sequence homology with regions of RNA polymerases from T3 and SP6 phages and yeast mitochondria.