



УДК 577.213.32

КОВАЛЕНТНОЕ МЕЧЕНИЕ ФРАГМЕНТА КЛЕНОВА  
ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I *E. COLI**Дегтярев С. Х.\**, *Зайчиков Е. Ф.\*\**, *Лаврик О. И.*,  
*Митина Р. Л.*, *Мустаев А. А.\*\**, *Рихтер В. А.**Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР;**\* НИКТИ БАН, Бердск;**\*\* Лимнологический институт Сибирского отделения Академии наук  
СССР, Иркутск*

Показано, что инкубация фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* (КФ 2.7.7.7) с дезоксирибо- и рибонуклеозидтрифосфатами ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ ) приводит к ковалентному мечению фермента. Ковалентная связь, образуемая  $^{32}\text{P}$ -радиоактивными остатками нуклеотидов, стабильна как в кислых (рН 2), так и в щелочных условиях (рН 12). Значительное ингибирование радиоактивного мечения наблюдается в присутствии нуклеофилов, таких, как  $\beta$ -меркаптоэтиламин. Предполагается, что мечение фермента происходит в результате образования химически активных продуктов радиолиза  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ , возможно, радикальной природы. Нерадиоактивные NTP защищают фермент от ковалентного присоединения метки. Ионы  $\text{Mg}^{2+}$  и полинуклеотиды не влияют на уровень ковалентного присоединения. Расщеплением  $^{32}\text{P}$ -меченого фрагмента Кленова по специфическим аминокислотным последовательностям с последующим анализом радиоактивных продуктов показано, что  $^{32}\text{P}$ -метка локализована в белке между Gly-544 и Met-647. Обнаруженный тип ковалентного мечения фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I может быть использован для дальнейшего структурно-функционального анализа этого фермента.

В настоящее время для изучения структуры и функции ферментов широко применяется метод аффинной модификации [1]. Этот метод основан на получении реакционноспособных аналогов субстратов, сохраняющих способность к специфическому узнаванию активных центров ферментов. Альтернативные методы ковалентного присоединения субстратов, без предварительного химического синтеза реакционноспособных производных, основаны преимущественно на УФ-облучении их комплексов с ферментами. Этот подход не лишен недостатков, связанных с инактивацией белков при УФ-облучении. Поиск других способов мечения белков, позволяющих специфически вводить в них радиоактивную метку, представляет значительный интерес.

При исследовании фрагментов Кленова ДНК-полимеразы I (КФ 2.7.7.7) нами было обнаружено, что инкубация фермента с  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$  приводит к ковалентному присоединению радиоактивной метки к белку. Настоящая работа посвящена изучению этого явления.

Результаты экспериментов по мечению фрагмента Кленова в присутствии  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  свидетельствуют, что с течением времени включение радиоактивной метки в белок возрастает (рис. 1А, б-е) и через 16 ч стехиометрия мечения достигает  $\sim 0,05\%$  (рис. 1Б). Обработка проназой приводит к исчезновению радиоактивной полосы (рис. 1А, ж), в то время как предварительная обработка ДНКазой не влияла на интенсивность ковалентного мечения (рис. 1А, з). Поэтому можно сделать вывод, что мечению действительно подвергается фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I.

Оказалось также, что мечение могут вызывать различные рибо- и дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (рис. 2, а-э). Очистка препарата

Использованные сокращения: НЕРЕС - 4-(2-гидроксиэтил-1-пиперазинсульфоно-вая кислота.

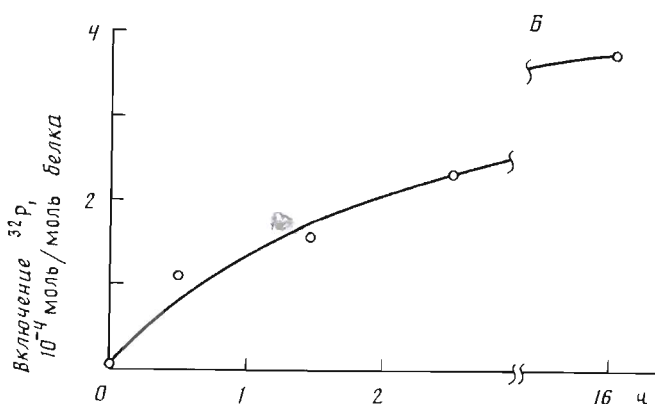
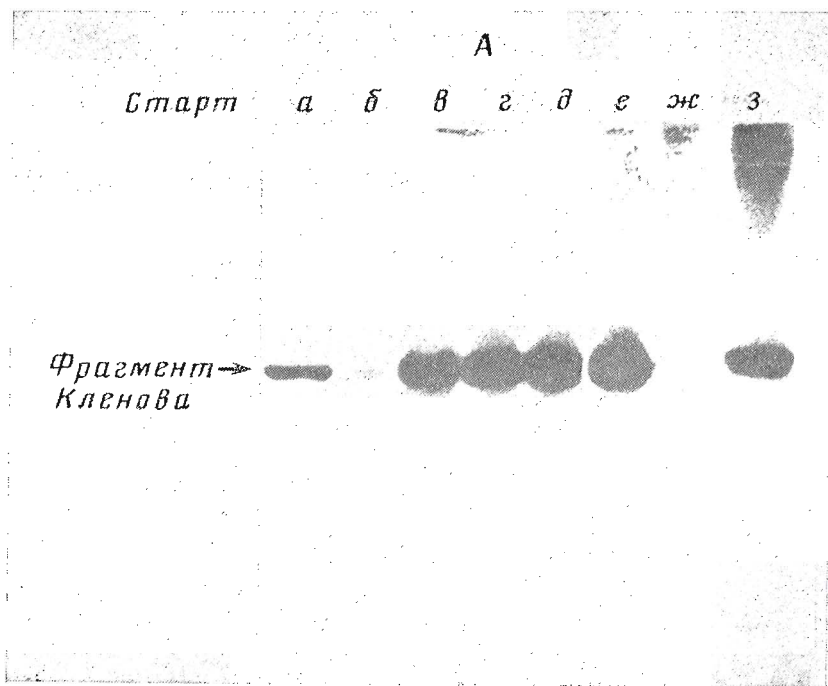


Рис. 1. «Неферментативное мечение» фрагмента Кленова действием  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ . А — результаты электрофоретического разделения смесей, содержащих фрагмент Кленова: а — немодифицированный фрагмент Кленова, гель окрашен кумасси; б–з — авторadiограммы гелей, разделение реакционных смесей: инкубацию фрагмента Кленова с  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  проводили в стандартных условиях 0 (б), 0,5 (в), 1,5 (г), 2,5 (д) или 16 ч (е); ж и з — то же, что е, но смесь после мечения обработана соответственно проназой (20 мкг/мл, 37° С, 30 мин) или ДНКазой I (20 мкг/мл, 37° С, 30 мин). Б — кинетика включения радиоактивности в белок по данным скитализационного счета гелей, приведенных на рис. 1А (б–е)

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  с помощью ВЭЖХ не уменьшает его способности метить фермент, что исключает предположение о включении метки за счет примесей в препаратах меченых соединений (рис. 2и).

Следует отметить, что заметное влияние на интенсивность мечения оказывала природа и концентрация используемого буфера. Так, уровень включения радиоактивности был значительно выше в том случае, когда использовали HEPES (рис. 3б, г, ж). Уровень мечения в случае трибуфера зависел от его концентрации (рис. 3в–е).

Аналогичное явление неферментативного мечения было обнаружено ранее для ряда белков [2], однако его природа до сих пор не выяснена. На радикальный механизм мечения указывает тот факт, что  $\beta$ -меркаптоэтиламин (являющийся, как известно, эффективной «ловушкой» для сво-

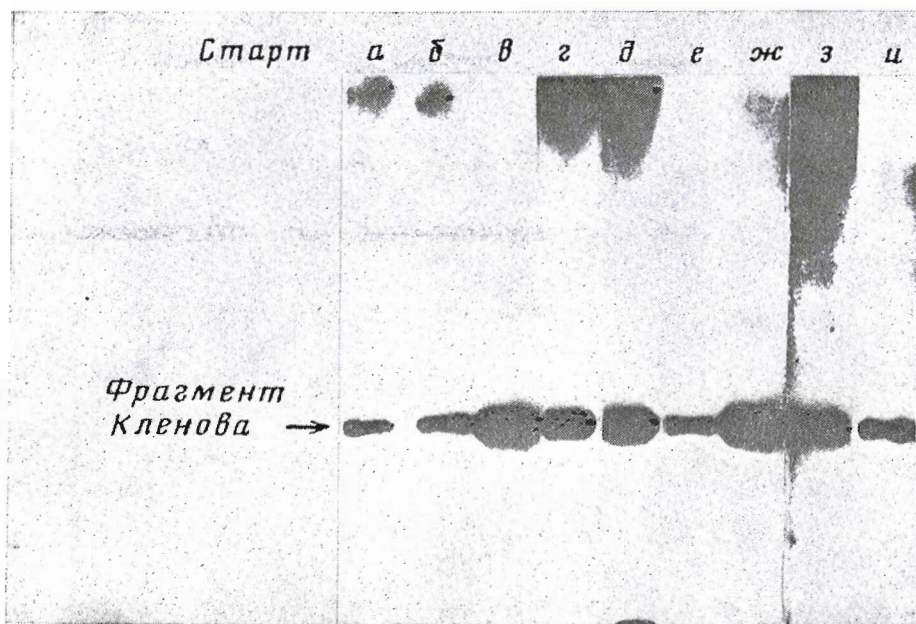


Рис. 2. Мечение фрагмента Кленова различными  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ : а —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ ; б —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ; в —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ ; г —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ ; д —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ; е —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ ; ж —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ; з —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ ; и —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , очищенный ВЭЖХ

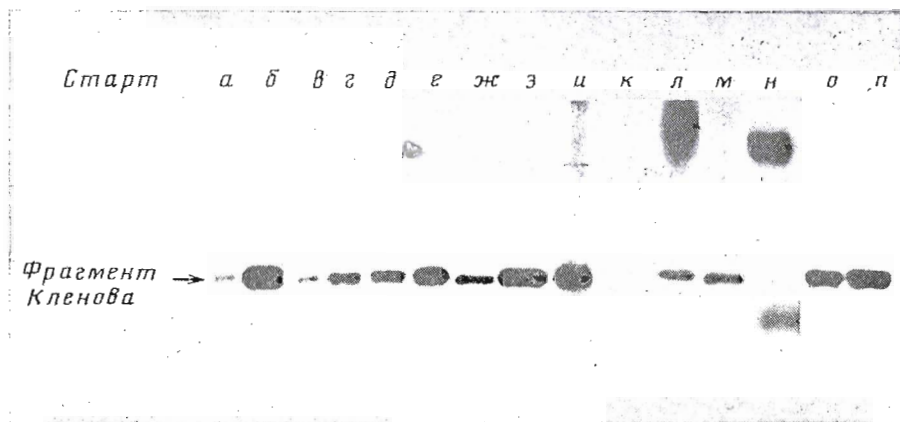


Рис. 3. Включение  $^{32}\text{P}$ -метки во фрагмент Кленова в зависимости от условий инкубации. Мечение  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  вели 16 ч со следующими изменениями относительно стандартных условий (дорожка б): перед мечением добавляли: а —  $\beta$ -меркаптоэтиламин до 10 мМ, л — нерадиоактивный dATP или м — dCTP до 1 мМ; н — poly(dT) до 1 мкМ; к — фермент предденатурировали 10 мин при  $95^\circ$ ; п —  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  обрабатывали щелочной фосфатазой (1 мкг/мл,  $56^\circ\text{C}$ , 40 мин); в инкубационной смеси HEPES заменяли на 100 мМ трис (в), 50 мМ трис (г), 25 мМ трис (д) или 20 мМ К-фосфатный буфер (ж); е — инкубация без буфера; после инкубации с  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  смесь обрабатывали щелочной фосфатазой (1 мкг/мл,  $56^\circ\text{C}$ , 40 мин) (о); инкубировали 100 мин при  $37^\circ\text{C}$  и pH 2 (з) или 2 ч при  $37^\circ\text{C}$  и pH 12 (и)

бодных радикалов) ингибирует мечение (рис. 3а). Предварительная инкубация  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  с щелочной фосфатазой в условиях полного расщепления полифосфатной цепи NTP до фосфата предотвращала мечение фермента (рис. 3н)\*. Можно предположить, что ковалентное включение радиоактивности в белок происходит благодаря радиолизу, приводящему

\* При этом наблюдалось мечение щелочной фосфатазы, что согласуется с известным механизмом действия этого фермента, включающим фосфорилирование остатка серина в активном центре [3].

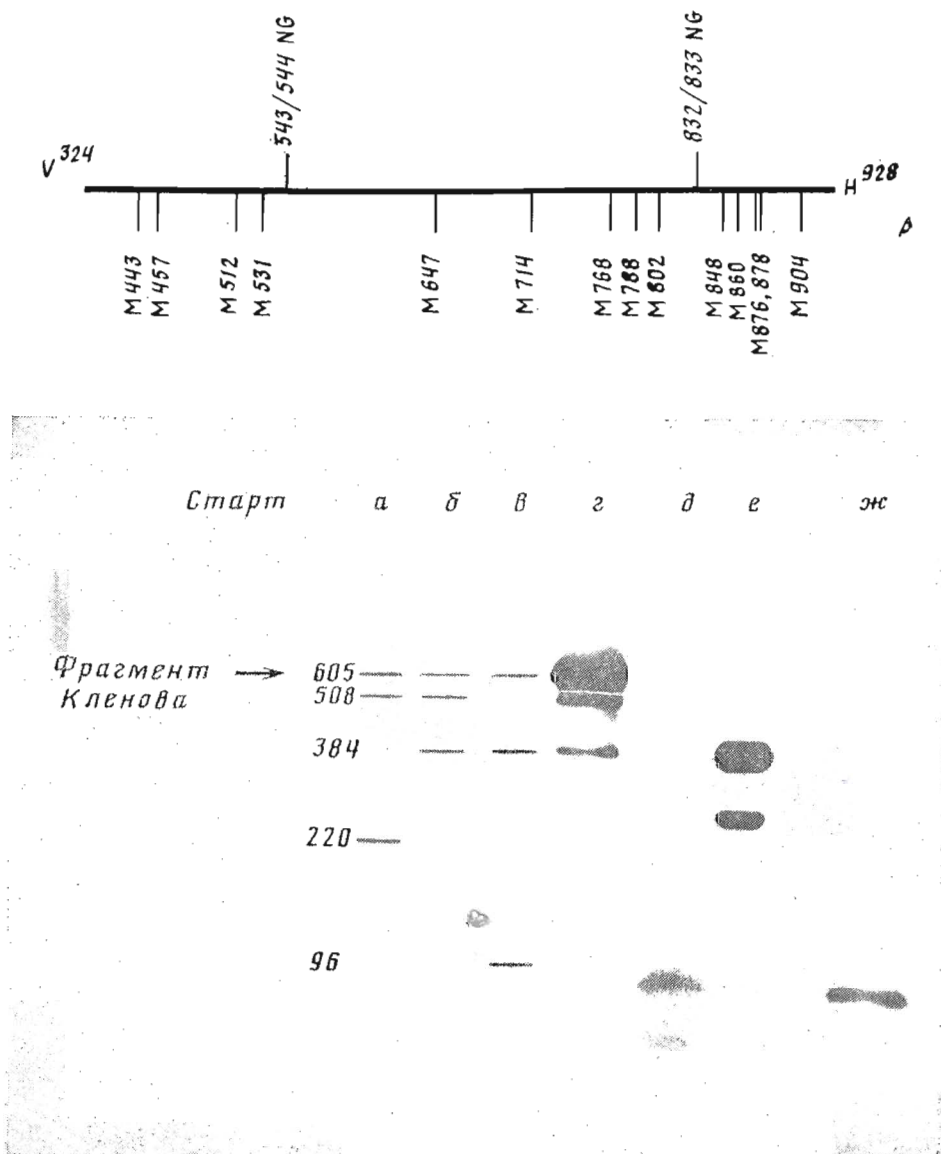


Рис. 4. Расщепление  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ -меченого фрагмента Кленова (мечение в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$ ) гидроксиламином и бромцианом. А — карты расположения остатков метионина (М) и дипептидных последовательностей Asn-Gly(NG) на первичной структуре фрагмента Кленова. Цифры обозначают номера соответствующих остатков. Б. а-в — теоретические картины расположения продуктов расщепления фермента гидроксиламином для случаев, когда метка расположена левее Gly-544 (а), между Gly-544 и Asn-832 (б) и правее Asn-832 (в); г-ж — автордиограмма SDS-гелей; г — ограниченное (2 ч) расщепление меченого фермента гидроксиламином; д — исчерпывающий гидролиз бромцианом меченого фермента; е — очищенные пептиды Gly-544-His-928 и Gly-544-Asn-832 глубокого (10 ч) гидролиза гидроксиламином; ж — исчерпывающий гидролиз бромцианом пептидов Gly-544-His-928 и Gly-544-Asn-832

к образованию химически активных производных NTP, являющихся своего рода «аффинными реагентами» для фермента [4].

Ковалентная связь, образуемая радиоактивными остатками с белком, стабильна как в кислых (pH 2), так и в щелочных (pH 12) условиях (рис. 3з, и). Обработка меченого фрагмента Кленова щелочной фосфатазой практически не влияет на интенсивность мечения (рис. 3о).

Представлялось интересным выяснить, насколько специфично наблюдаемое «неферментативное мечение». Отсутствие мечения денатурированного белка (рис. 3к) свидетельствует о том, что для его осуществления

необходимо сохранение нативной структуры фермента. Добавление в инкубационную смесь, содержащую [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP, избытка нерадиоактивных dATP или dCTP существенно снижало уровень мечения (рис. 3*л, м*). Это говорит о том, что мечение происходит в районе сайтов связывания нуклеотидов. В то же время это взаимодействие не является  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимым, так как исключение ионов  $\text{Mg}^{2+}$  не изменяло уровня ковалентного присоединения метки (рис. 3*е*).

Представляло интерес локализовать участок фермента, к которому присоединяется радиоактивная метка. Для этого был использован подход, основанный на ограниченном статистическом расщеплении меченого белка по специфическим аминокислотным последовательностям и определении длин образующихся радиоактивных продуктов расщепления [5]. Известно, что гидроксилламин расщепляет пептидную связь между расположенными рядом остатками аспарагина и глицина [6, 7]. В данном белке имеется две такие связи: Asn-543—Gly-544 и Asn-832—Gly-833 [8] (рис. 4*А*). В соответствии с этим наблюдается два радиоактивных продукта расщепления (рис. 4*Б, г*). На рис. 4*Б(а-в)* приведены теоретические картины расположения радиоактивных продуктов расщепления для случаев, когда метка расположена левее Gly-544 (*а*), между Gly-544 и Asn-832 (*б*) и правее Asn-832 (*в*). Наблюдаемая картина соответствует той ситуации, когда метка локализована между Gly-544 и Asn-832.

Исчерпывающее расщепление меченого белка бромцианом приводит к появлению одного основного радиоактивного продукта с мол. массой  $\sim 13$  кДа (рис. 4*Б, д*). Среди теоретических продуктов расщепления фрагмента Кленова по остаткам метионина имеется только два таких крупных полипептида: Met-531—Met-647 и Val-324—Met-458 (рис. 4*А*). Исходя из вышеприведенных данных по ограниченному расщеплению гидроксилламинном (рис. 4*Б, а-г*), второй из этих пептидов можно исключить. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что при исчерпывающем бромциановом гидролизе фрагментов белка Gly-544—Asn-832 и Gly-544—His-928 (продуктов расщепления гидроксилламинном) также образуется полипептид весом  $\sim 13$  кДа (рис. 4*Б, е, ж*), соответствующий ожидаемому (Gly-544—Met-647).

Поскольку ограниченное расщепление фрагмента Кленова гидроксилламинном выявляет радиоактивный пептид Gly-544—Asn-832, а исчерпывающее расщепление бромцианом — Met-531—Met-647, можно сделать вывод, что радиоактивная метка локализована между Gly-544 и Met-647.

Таким образом, из данных по структурной локализации метки следует, что неферментативное мечение происходит скорее всего в определенном участке фрагмента Кленова. Поскольку мечение ингибируется нерадиоактивными dNTP, можно полагать, что оно происходит по нуклеотид-связывающему участку.

Обнаруженная область мечения фрагмента Кленова пространственно удалена от остатков Lys-758, Tyr-766 и His-881, которые, согласно ряду работ [9—11], являются компонентами dNTP-связывающего участка фермента. В то же время, согласно пространственной структуре фермента [12], эта область находится в непосредственной близости к ДНК-связывающему участку [13]. Однако добавление односторонней матрицы не препятствовало мечению белка (рис. 3*н*). Это обстоятельство, а также отсутствие влияния  $\text{Mg}^{2+}$  на уровень мечения фермента затрудняют заключение о функциональной роли участка белка, подвергающегося мечению. Этот вопрос требует дальнейшего анализа.

В то же время обнаруженная способность NTP, меченных  $^{32}\text{P}$ , к введению  $^{32}\text{P}$ -метки во фрагмент Кленова может быть использована в работе по структурно-функциональному анализу этого фермента.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, выделенный из суперпродукентного штамма *E. coli* ВКПМ В-3825 (рис. 1*а*); проназа (Koch-Light Laboratories, Англия); щелочная фосфата-



за (Boehringer Mannheim, ФРГ); NMV-kit (Serva, ФРГ); poly(dT), dATP-натриевая соль (НИКТИ БАВ, Бердск); BrCN (Sigma, США); HEPES (Serva, ФРГ); [ $\alpha$ - $^{32}$ P]NTP, уд. акт. > 1000 Ки/ммоль («Изотоп», СССР); остальные реактивы квалификации х.ч. и ос.ч.

Мечение фрагмента Кленова проводили при 37°C в 40 мкл реакционной смеси состава 50 мМ HEPES/NaOH-буфер, pH 8, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,25 мМ EDTA, 0,5 мМ KCl, 10<sup>-6</sup> М [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dNTP(NTP), 10<sup>-6</sup> М фрагмент Кленова. Реакцию останавливали добавлением 1/4 объема денатурирующей смеси, содержащей 5% SDS, 5%  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,5% бромфеноловый синий, 50% глицерин, нагревали 10 мин при 56°C и проводили электрофорез по Лэммли [14].

Расщепление меченого фрагмента Кленова по Asn-Gly осуществляли по методу [6, 7]. Меченый белок инкубировали сначала с 1% SDS и 1%  $\beta$ -меркаптоэтанолом 30 мин при 37°C, а затем 2 ч при 37°C с 1 М гидроксилламина в 0,1 М K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.

Исчерпывающее расщепление меченого белка бромцианом проводили аналогично ограниченному расщеплению [5] в течение 24 ч, добавляя в начале реакции и через 12 ч 1/10 объема 1 М бромциана. После окончания реакции пробы лиофильно высушивали и наносили на гель.

ВЭЖХ проводили на колонке BONDORAK C-18 (Милипор, Waters).

Авторы выражают благодарность С. В. Дорониной (НИБХ) за участие в обсуждении результатов работы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лаврик О. И., Невинский Г. А. // Итоги науки и техники. Сер. Биоорганическая химия. М.: ВИНТИ, 1988. С. 4–172.
2. Schmidt M. C., Hanna M. M. // FEBS Lett. 1986. V. 194. № 2. P. 305–308.
3. Schwartz J. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1963. V. 49. № 6. P. 871–878.
4. Сележинский И. И. Биополимеры: кинетика радиационных и фотохимических превращений. М.: Наука, 1988. С. 214.
5. Грачев М. А., Мустаев А. А., Колочева С. И. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 3. С. 723–727.
6. Bornstein P. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1969. V. 36. № 6. P. 957–964.
7. Butler W. T. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 12. P. 3415–3417.
8. Joyce C. M., Kelley N. E., Grindley N. D. F. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 4. P. 1958–1964.
9. Basu A., Modak M. J. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 6. P. 1704–1709.
10. Pandey V. N., Williams K. R., Stone K. L., Modak M. J. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 24. P. 7744–7748.
11. Ferrin L. J., Mildvan A. D. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 18. P. 5131–5145.
12. Ollis D. L., Brick P., Hamlin R., Huang N. G., Steitz T. A. // Nature. 1985. V. 313. № 6005. P. 762–766.
13. Mohan P. M., Basu A., Basu S., Abraham K. I., Modak M. J. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 1. P. 226–233.
14. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.

Поступила в редакцию  
2.I.1989

#### COVALENT LABELLING OF THE KLENOW FRAGMENT OF *E. COLI* DNA POLYMERASE I

DEGTYAREV S. N.\*, ZAYCEVICH E. F.\*\*, LAVRIK O. I., MITINA R. L.,  
MUSTAEV A. A.\*\*, RIKHTER V. A.

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

*\* Institute of Biologically Active Compounds, Berdsk, Novosibirsk  
Region;*

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

Incubation of the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I with [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dNTP (or NTP) results in the covalent radiolabelling of the enzyme, the bond being stable in acid (pH 2) and alkaline (pH 12) conditions and nucleophyls, such as  $\beta$ -mercaptoethylamine, efficiently inhibiting the labelling. It is suggested that radiolabelling of the enzyme is the result of formation of chemically active products of the radiolysis of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]NTP (which are likely to be radicals). Non-radioactive NTP hinder the labelling, whereas Mg<sup>2+</sup> and polynucleotide do not affect it. Cleavage of the enzyme by hydroxylamine and cyanogen bromide and analysis of gel-electrophoretic patterns of the cleavage products led to conclusion that  $^{32}$ P-label is located between Gly-544 and Met-647.