



УДК 577.152.277

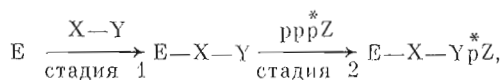
© 1990 г.

*Т. Г. Максимова, А. А. Мустаев, Е. Ф. Зайчиков,
А. В. Полухин*, В. К. Райт**

ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОЕ АФФИННОЕ МЕЧЕНИЕ ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА

*Лимнологический институт СО АН СССР, Иркутск;
Новосибирский государственный университет

Один из главных подходов, применяемых для изучения активных центров ферментов, основан на введении радиоактивной, флуоресцентной или какой-либо другой метки в район связывания субстратов с помощью их химически активных аналогов. Сравнительно недавно был предложен метод, обеспечивающий исключительно селективное введение радиоактивной метки по участкам связывания РНК-полимераз. Метод основан на эндокаталитическом присоединении радиоактивного субстрата к остатку аналога иницирующего нуклеотида, ковалентно фиксированного в районе активного центра на первой стадии аффинной модификации:

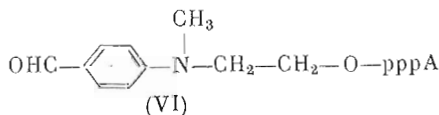
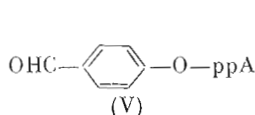
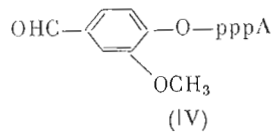
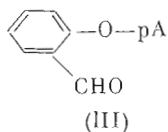
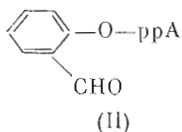
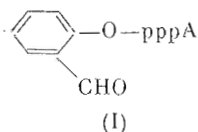


E — РНК-полимераза; Y — остаток NMP, NDP или NTP; X — реакционноспособная группировка; $pppZ^*$ — $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$.

К настоящему времени метод применен для исследования активных центров РНК-полимераз вирусов, архебактерий [1—4], а также двух представителей эукариот (пшеницы и дрожжей [5, 6]). Несомненный интерес в эволюционном плане представляет распространение его на РНК-полимеразы высших эукариот.

До сих пор для аффинного мечения в большинстве случаев использовались высокоочищенные препараты ферментов (как правило, индивидуальные). Однако преимущество упомянутого выше подхода состоит в отсутствии необходимости в препаратах индивидуальных ферментов. В работе [3] была продемонстрирована возможность регистрировать аффинное мечение с использованием грубого экстракта из ядер клеток табака. В данной работе использован препарат частично очищенной РНК-полимеразы II из плаценты человека. Очистка включала в себя гомогенизацию ткани в среде с низкой ионной силой в присутствии детергента NP-40, хроматографию экстракта на DEAE-целлюлозе и осаждение сульфатом аммония.

Для аффинного мечения использовали следующие производные АТР, АДФ и АМР:



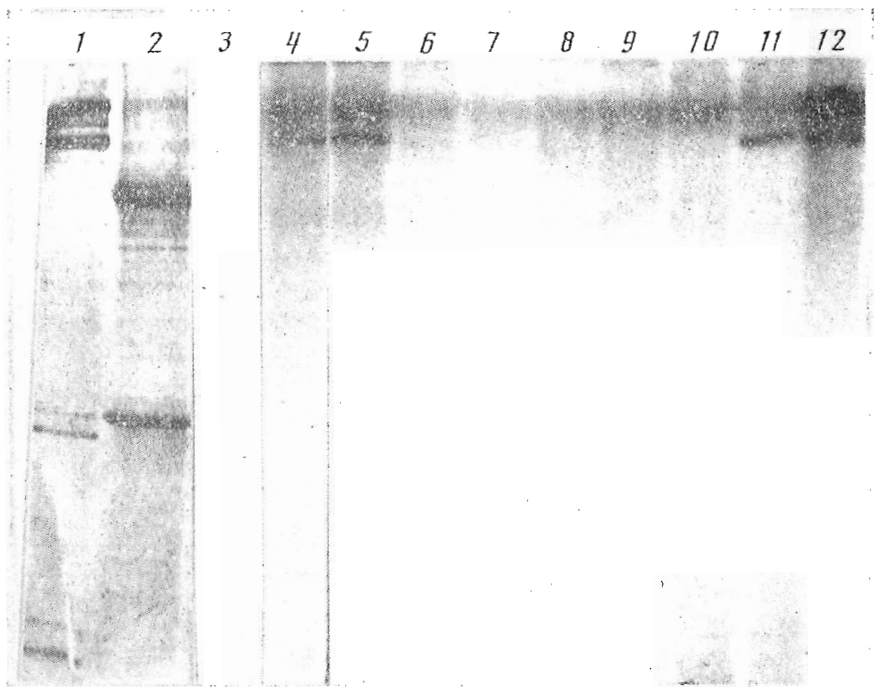


Рис. 1. Аффинное мечение РНК-полимеразы из плаценты человека *o*-формилфениловым эфиром АМР (реагент III). Дорожка 12 — реакцию смесь (10 мкл), содержащую 30 мМ трис-НСl (рН 8), 2 мМ $MnCl_2$, 2 мМ дитиотреит, 50 мг/мл poly[d(A-T)], 1 мМ реагент (III) и 2 мкл препарата фермента (5,2 мг/мл белка, 0,55 ед. акт./мл [7]), инкубировали 15 мин при 37° С, добавляли боргидрид натрия до 10 мМ и инкубировали еще 30 мин при 0° С. В смесь добавляли $[\alpha\text{-}^{32}P]UTP$ (3000 Ки/ммоль) до 1 мКи/мл, выдерживали 15 мин при 37° С, добавляли 3 мкл денатурирующей смеси (5% меркаптоэтанол — 5% додецилсульфат натрия — 0,1% бромфеноловый синий — 50% глицерин), прогревали 15 мин при 56° С и подвергали диск-электрофорезу [8] в 10% ПААГ (10 × 10 × 0,05 см). Остальные эксперименты проводили со следующими изменениями: 11 — одновременно с реагентом в смесь добавляли АТР (до 1 мМ); 10 — вместо реагента добавлен АТР; 9 — не добавляли реагента; 8 — не добавляли poly[d(A-T)]; 7 — не добавляли боргидрид натрия; 6 — перед добавлением $[\alpha\text{-}^{32}P]UTP$ добавляли α -аманитин (до 2 мкг/мл); 5—3 — после элонгации смесь инкубировали (30 мин, 37° С) соответственно с РНКазой А (1 мг/мл), с ДНКазой I (10 мкг/мл) или с проназой Е (1 мкг/мл). После электрофореза гель окрашивали кумасси R-250, высушивали и автордиографировали. 2, 7 — окрашенные гели с РНК-полимеразой человека и пшеницы

Все эти аффинные реагенты содержат альдегидные группы, способные обратимо реагировать с первичными аминогруппами аминокислотных остатков (ϵ -аминогруппой лизина или α -аминогруппой N-концевой аминокислоты). Восстановление образующегося основания Шиффа с помощью боргидрида натрия приводит к необратимой фиксации остатка аффинного реагента на ферменте. После эндокаталитической элонгации ковалентно связанных остатков с помощью $[\alpha\text{-}^{32}P]UTP$ белок денатурировали и подвергали диск-электрофорезу в присутствии додецилсульфата натрия.

Аффинное мечение с использованием реагента (III) приводит к включению радиоактивности в полимер, имеющий при электрофорезе подвижность, равную подвижности р140-субъединицы РНК-полимеразы II из проростков пшеницы (рис. 1, 12). Продукт мечения устойчив к обработке РНКазой и ДНКазой, но пропадает после обработки реакционной смеси проназой (рис. 1, 3—5). Следовательно, мишенью мечения является белок с молекулярной массой 140 кДа. Мечение высокоселективно: радиоактивность включается в один из многочисленных полипептидов, присутствующих в препарате фермента. Мечения не наблюдалось при исключении из реакционной смеси матрицы, реагента или при замене реагента на АТР (рис. 1, 8—10), что свидетельствует о мечении нуклеотидсвязывающего

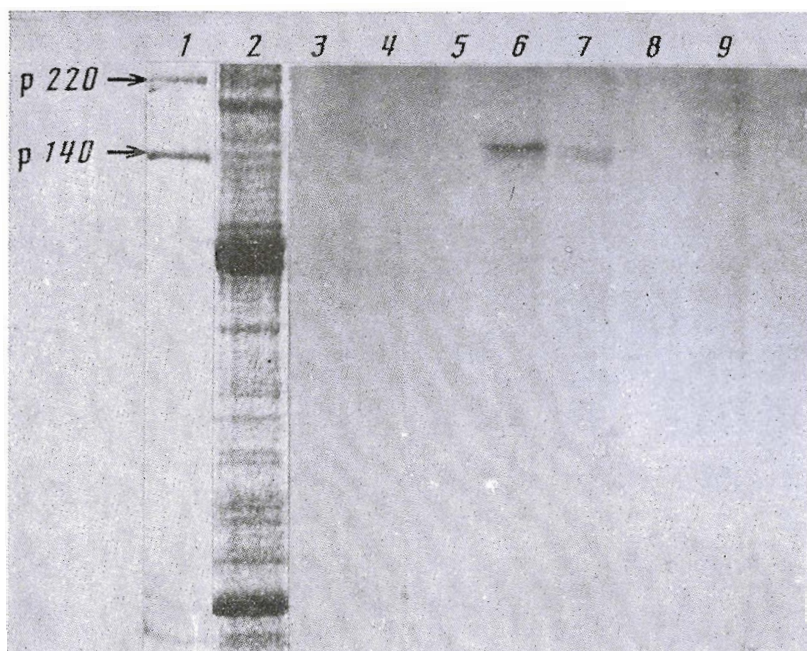


Рис. 2. Аффинное мечение РНК-полимеразы II из плаценты человека с помощью реагентов (I)—(VI). Мечение проводили так же, как в случае реагента (III) (рис. 1, 12), используя реагенты (I) (4), (II) (5), (III) (6), (IV) (7), (V) (8) или (VI) (9). 3 — эксперимент с АТР вместо реагента. 1, 2 — окрашенные гели с очищенным препаратом РНК-полимеразы II из проростков пшеницы и частично очищенным препаратом РНК-полимеразы человека

центра РНК-полимеразы. Мечению подвергается РНК-полимераза класса II, поскольку оно ингибируется низкими (2 мкг/мл) концентрациями α -аманитина (рис. 1, 6). При исключении из процедуры стадии обработки боргидридом натрия мечение пропадает (рис. 1, 7); следовательно, реакция идет через образование основания Шиффа.

Известно, что РНК-полимераза II из плаценты человека содержит субъединицу (вторую по величине) с молекулярной массой 140 кДа [7]. Поэтому можно утверждать, что аффинному мечению подвергается именно эта субъединица. Аффинное мечение РНК-полимераз из других источников (в том числе и эукариот) также затрагивало вторые по величине субъединицы [3, 5, 6] либо (в случае некоторых архебактерий [2]) субъединицы, родственные вторым по величине субъединицам архебактериальных и эукариотических РНК-полимераз. Таким образом, полученные результаты подтверждают сделанный ранее вывод о функциональной гомологии вторых по величине субъединиц РНК-полимераз про- и эукариот.

Из шести испытанных реагентов наиболее эффективны реагенты (III) и (IV) (рис. 2). Для реагента (IV) выполняются все те же критерии на специфичность, что и для реагента (III). Эти реагенты были в числе наиболее эффективных и в случае других РНК-полимераз [1—6], что свидетельствует в пользу предположения о сходстве строения активного центра различных РНК-полимераз, например, о наличии функционально важного остатка лизина вблизи α -фосфата иницирующего субстрата, выявляемого реагентом (III).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grachev M. A., Kolocheva T. I., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 113—121.
2. Thomm M., Lindner A. J., Hartmann G. R., Stetter K. O. // System. Appl. Microbiol. 1988. V. 10. № 1. P. 101—105.

3. Hartmann G. R., Biebricher C., Glaser S. J., Gross F., Katzmeier M. J., Lindner A. J., Mosig H., Nasheuer H.-P., Rothman-Denes L. B., Schäffner A. R., Schneider G. J., Stetter K.-O., Thomm M. // *Biol. Chem. Hoppe — Seyler*. 1988. B. 369. S. 775—788.
4. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Лухтанов Е. А., Максимова Т. Г., Мустаев А. А. // *Биоорганическая химия*. 1987. Т. 13. № 4. С. 568—570.
5. Grachev M. A., Hartmann G. R., Maximova T. G., Mustaev A. A., Schäffner A. R., Sieber H., Zaychikov E. F. // *FEBS Lett.* 1986. V. 200. № 2. P. 287—290.
6. Riva M., Schäffner A. R., Sentenac A., Hartmann G. R., Mustaev A. A., Zaychikov E. F., Grachev M. A. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 30. P. 14377—14380.
7. Freund E., McGuire P. M. // *J. Cell. Physiol.* 1986. V. 128. № 3. P. 432—438.
8. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступило в редакцию
13.VII.1989

T. G. MAXIMOVA, A. A. MUSTAEV, E. F. ZAYCHIKOV, A. V. POLUKHIN*,
V. K. REIT*

HIGHLY SELECTIVE AFFINITY LABELLING OF HUMAN PLACENTA DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE

*Limnological Institute, Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR, Irkutsk:
Novosibirsk State University, Novosibirsk

RNA polymerase II from human placenta was affinity labelled in crude preparation using two-step technique, which includes treatment of the enzyme with an aldehyde-containing reactive analogue of ATP, ADP or AMP in the presence of poly[d(A—T)] followed (after borohydride reduction) by the elongation of the attached label with [α - 32 P]UTP. A polypeptide of the molecular mass ca. 140 kDa proved to be the labelling target. No labelling was observed in the absence of poly[d(A—T)] or the reagent or in the presence of α -amanitin. All the results suggest the attachment of the affinity reagents to the second-largest subunit of the human RNA polymerase II, which therefore takes part in the initiation substrate's binding.