



УДК 547.96 : 543.544

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ КАРТ
 α -СУБЪЕДИНИЦ РНК-ПОЛИМЕРАЗ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА
ENTEROBACTERIACEAE

Лилкин В. М., Модянов Н. Н., Кочергинская С. А.,
Чертов О. Ю., Никифоров В. Г., Лебедев А. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Институт атомной энергии им. И. В. Курчатова, Москва

Проведено сравнение пептидного состава триптического гидролизата α -субъединиц РНК-полимераз *E. coli* K12, *Serratia marcescens* и *Proteus mirabilis* с пептидным составом α -субъединицы *E. coli* В. Для этого [^{14}C]- α -субъединицы исследуемых РНК-полимераз, осажденных из клеточных экстрактов антителами против минимального фермента *E. coli* В, гидролизовали в присутствии большого избытка немеченой α -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* В и смесь пептидов разделяли на пластинке с тонким слоем целлюлозы. Положение пептидов определяли автораддиографически и окраской нингидрином, что позволяло получить на одной пластинке одновременно пептидные карты α -субъединиц РНК-полимераз двух бактерий. Предложенный метод позволяет проводить сравнительное изучение пептидного состава белков в совершенно идентичных условиях, используя микрограммовые количества радиоактивно меченных образцов.

Пептидные карты *E. coli* В, *E. coli* K12 и *S. marcescens* полностью идентичны: большие различия наблюдались в пептидной карте *P. mirabilis*. Таким образом, α -субъединица РНК-полимеразы является эволюционно консервативным белком.

Сравнительное изучение первичной структуры гомологичных белков уже давно используется для выявления эволюционных и филогенетических отношений организмов. Для обнаружения различий в химической структуре сравниваемых белков часто используют метод пептидных карт. В том случае, если изучаемые белки обладают весьма близкой первичной структурой, для выявления небольших различий необходимо проводить картирование в строго идентичных условиях, что довольно трудно осуществить экспериментально.

В настоящей работе предлагается проводить сравнительный анализ структуры гомологичных белков путем изучения пептидных карт триптического гидролизата их смеси. Метод заключается в том, что один из белков, радиоактивно меченный по всем аминокислотам, берется в количествах, на несколько порядков меньших, чем второй, немеченый белок. Идентификация пептидов первого белка осуществляется автораддиографией, а второго — с помощью нингидрина. Это позволяет получить в одном опыте две независимые пептидные карты триптических гидролизатов разных белков и тем самым избежать влияния неидентичности экспериментальных условий в разных опытах. Для получения пептидной карты на пластинке с тонким слоем целлюлозы достаточно 5 нмоль немеченого белка и соответственно не более 50 пмоль радиоактивного меченого белка.

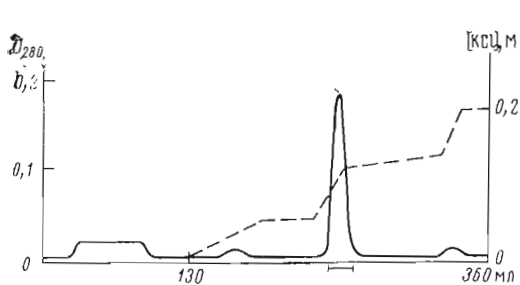


Рис. 1

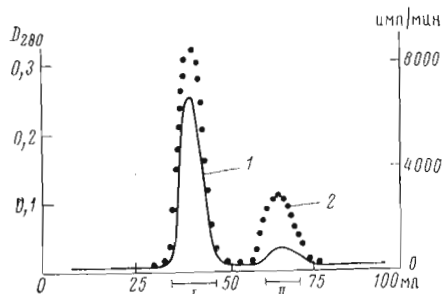


Рис. 2

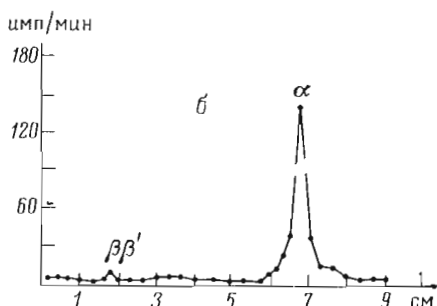
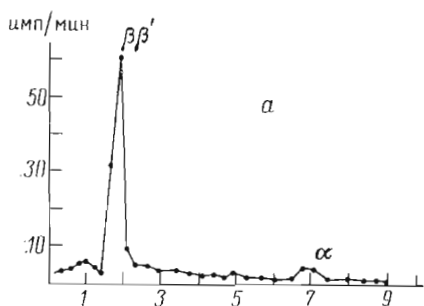


Рис. 3

Рис. 1. Очистка препарата α -субъединицы хроматографированием на колонке ($2,5 \times 9$ см) с DEAE-целлюлозой DE-52 в градиенте KCl. Скорость элюции 60 мл/ч; отмечена фракция, содержащая чистую α -субъединицу

Рис. 2. Гель-фильтрация на G-200 иммунопреципитата *Serratia marcescens* и минимального фермента *E. coli*: 1 — D_{280} , 2 — радиоактивность

Рис. 3. Электрофоретический анализ фракций I (a) и II (б), полученных при гель-фильтрации иммунопреципитата *Serratia marcescens* и минимального фермента *E. coli* (рис. 2) в полиакриламидном геле (5% акриламида, 0,1% додецилсульфата натрия [3])

Метод был использован для сравнения α -субъединиц РНК-полимераз бактерий кишечной группы *E. coli* B, *E. coli* K12, *Serratia marcescens* и *Proteus mirabilis*.

В основу препаративного метода разделения субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* была положена методика Хартмана [1], которая заключается в разделении α , β , β' -субъединиц на фосфоцеллюлозе P-11. В используемых условиях α -субъединица элюируется с объемом нанесения и таким образом, ее легко удается отделить от β - и β' -субъединиц. Однако препарат α -субъединицы содержит небольшие примеси других белков. Для его дальнейшей очистки мы использовали хроматографию на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52. Применив для элюирования специально подобранный градиент KCl, получили электрофоретически гомогенный препарат α -субъединицы РНК-полимеразы (рис. 1).

Для быстрого выделения микроколичеств меченой РНК-полимеразы из экстракта бактерий, выращенных на среде, содержащей [^{14}C]гидролизат белка, использовали иммунопреципитацию фермента антителами против минимальной РНК-полимеразы (РНК-полимеразы без σ -фактора) *E. coli* B. Это позволило получать с высоким выходом небольшие количества (порядка 10 мкг) меченой РНК-полимеразы.

Нами было обнаружено, что антитела против минимальной РНК-полимеразы *E. coli* дают реакцию преципитации с РНК-полимеразами всех видов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, а также с РНК-полимераза-

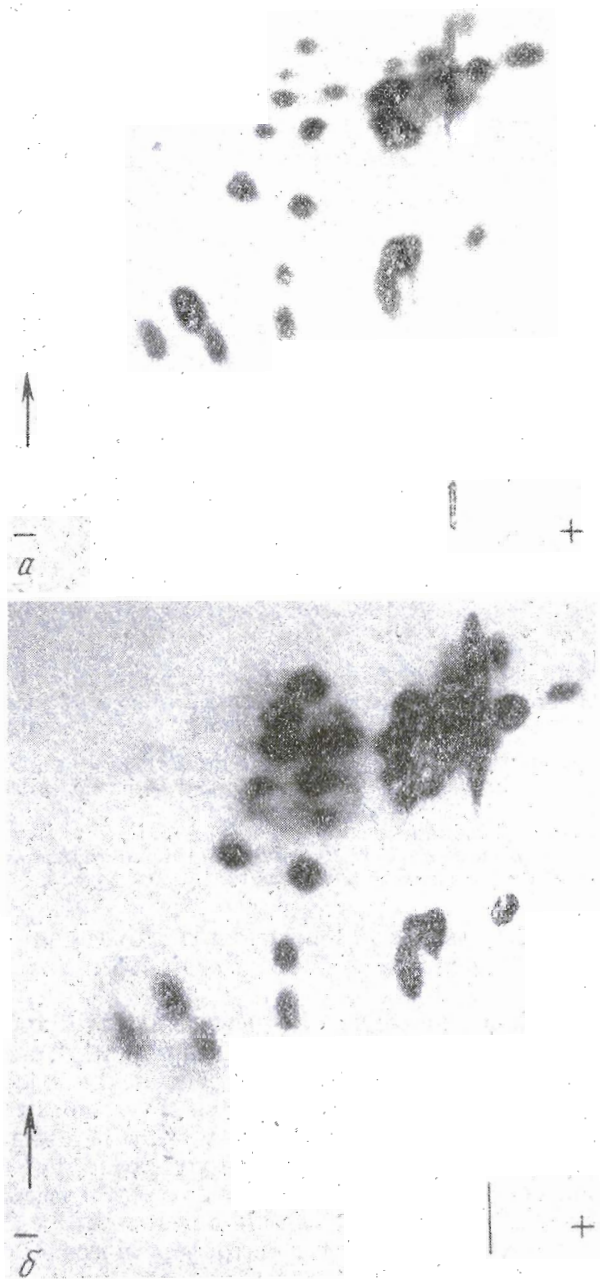


Рис. 4. Пентидная карта триптических пептидов смеси немеченой α -субъединицы *E. coli* и [^{14}C]- α -субъединицы *Serratia marcescens*: А — проявление нингидрином; В — авто-радиограмма

ми *Pseudomonas*. При сравнении РНК-полимераз бактерий кишечной группы методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони [2] нам не удалось выявить различий между ними. Поэтому с помощью антител против минимального фермента *E. coli* можно выделить РНК-полимеразу не только из *E. coli*, но и из всех бактерий кишечной группы, а с некоторыми модификациями и из бактерий семейства *Pseudomonas*.



Рис. 5. Пептидная карта триптических пептидов смеси немеченой α -субъединицы *E. coli* и [^{14}C]- α -субъединицы *Proteus mirabilis*: А — проявление нингидрином; Б — автордиограмма. Стрелками указаны пятна, которые при совмещении двух фотографий не совпадают

Для получения α -субъединицы иммунопреципитат, содержащий радиоактивную РНК-полимеразу, растворяли в присутствии 8 М мочевины и, добавив немеченый минимальный фермент *E. coli* В, разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-200 (рис. 2). Результаты электрофоретического анализа фракций, выделенных из иммунопреципитата *S. marcescens* (рис. 3), демонстрируют эффективность разделения. Аналогичные резуль-

таты были получены и при выделении меченой α -субъединицы РНК-полимеразы из *E. coli* В, *E. coli* К12 и *P. mirabilis*. Чистые препараты α -субъединицы содержали $(1-5) \cdot 10^6$ имп/мин.

Были получены пептидные карты меченых препаратов, смешанных с большим избытком немеченой α -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* В. Карты меченых субъединиц *E. coli* В, *E. coli* К12 и *S. marcescens*, проявленные с помощью автордиографии, полностью совпадали с картами немеченой α -субъединицы *E. coli* В, проявленной на той же пластинке с помощью нингидрина (рис. 4).

Этот результат, во-первых, подтверждает высокую степень чистоты меченых препаратов α -субъединиц, полученных с помощью антител, и, во-вторых, свидетельствует о том, что аминокислотные последовательности α -субъединиц РНК-полимераз *E. coli* В, *E. coli* К12 и *S. marcescens* если и не тождественны, то чрезвычайно близки.

На пептидной карте α -субъединицы РНК-полимеразы *P. mirabilis*, энтеробактерии, филогенетически наиболее далекой от *E. coli*, положение пяти пептидов отличается от положения соответствующих пептидов α -субъединицы *E. coli* В (рис. 5). Однако идентичность большинства других триптических пептидов указывает на большое сходство первичных структур α -субъединиц РНК-полимераз *E. coli* и *P. mirabilis*.

Были исследованы также пептидные карты α -субъединицы двух мутантов *E. coli* К12. Соответствующие мутации влияют на синтез субъединиц РНК-полимеразы и находятся в том же районе хромосомы, что и ген α -субъединицы [4]. Изменений в пептидной карте α -субъединиц этих мутантов обнаружено не было, что свидетельствует в пользу того, что ген α -субъединицы у них, по-видимому, не затронут.

Сопоставляя наши результаты с данными по сравнительному изучению других белков бактерий кишечной группы [5—8], можно сделать вывод, что первичная структура α -субъединицы РНК-полимеразы эволюционно сравнительно более консервативна. Так, например, пептидные карты изомераз антрапиловой кислоты *E. coli* и *Salmonella typhimurium* имеют лишь 50% общих пятен [8], хотя по ряду критериев *S. typhimurium* филогенетически существенно ближе к *E. coli*, чем *S. marcescens* [9], дающая идентичную с *E. coli* пептидную карту α -субъединицы РНК-полимеразы.

Сравнение третичных структур гомологичных белков показывает, что она весьма консервативна [10]. Это справедливо, по всей вероятности, и в отношении РНК-полимераз, так как в опытах *in vitro* удается собирать активные гибридные молекулы РНК-полимеразы из субъединиц весьма далеких видов бактерий [1, 11].

Известно, с другой стороны, что консервативность третичной структуры вполне совместима со значительной вариабельностью аминокислотной последовательности. Наибольшая изменчивость аминокислот наблюдается в участках, находящихся на поверхности белка, наименьшая — во внутренних участках, а также для остатков, непосредственно входящих в активные центры [10]. Это становится понятным, если учесть, что аминокислоты внутри белка (в частности, в местах контакта субъединиц мультимерных белков) упакованы очень плотно [12] и всякая замена, изменяющая объем или заряд аминокислоты, оказывается несовместимой с укладкой соседних аминокислот. В этом случае для сохранения общей структуры необходимо одновременное комплементарное изменение соседних аминокислот — событие крайне маловероятное.

В настоящее время ничего не известно о функциональной роли α -субъединицы в составе РНК-полимеразы. Однако консервативность ее первичной структуры наводит на мысль, что она несет большую функциональную нагрузку. Возможно, большая часть ее поверхности участвует во взаимодействии с другими субъединицами или с регуляторными белками, контактирующими с РНК-полимеразой.

Описанная в настоящей статье методика используется нами для выявления мутантов, имеющих дефекты в гене α -субъединицы. Обнаружение и изучение свойств таких мутантов позволило бы подойти к пониманию функциональной роли α -субъединицы РНК-полимеразы.

Экспериментальная часть

Минимальную РНК-полимеразу *E. coli* В выделяли по методике Бёржеса [13].

*Выделение немеченой α -субъединицы из РНК-полимеразы *E. coli* В.* 250 мг минимальной РНК-полимеразы из *E. coli*, высаженной насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, растворяли в 25 мл буфера Д (8 М мочевины, 0,01 М трис-НСl (рН 8,0), 0,1 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, 0,1 М KCl). Раствор инкубировали при 30° в течение 1 ч, а затем диализовали против буфера Р (0,05 М трис-НСl (рН 8,0), 7 М мочевины, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 5% глицерина по объему) до электропроводности 3 мСм, определяемой с помощью кондуктометра СДМ-3 (Radiometer, Дания). Раствор наносили на колонку (5 × 30 см) с фосфоцеллюлозой Р-11, термостатируемую при 4° и уравновешенную буфером Р. Фракцию, выходящую в объеме нанесения и содержащую α -субъединицу, наносили на колонку (2,5 × 9 см) с DEAE-целлюлозой DE-52, уравновешенную 0,05 М трис-НСl-буфером (рН 7,9), содержащим 8 М мочевины, 0,1 мМ дитиотреит. Элюирование белка проводили этим же буфером в ступенчатом градиенте KCl (Ultragrad, LKB, Швеция) (рис. 1). Фракцию, содержащую α -субъединицу, обессоливали на колонке (2,5 × 40 см) с сефадексом G-15, уравновешенным водой, подщелоченной аммиаком до рН 10,0; затем лиофилизовали. Выход α -субъединицы ~40 мг.

Получение антител против минимальной РНК-полимеразы. Минимальную РНК-полимеразу в физиологическом растворе смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда и вводили кроликам (по 0,1 мл на животное, 0,5 мг РНК-полимеразы) непосредственно в оба подколенных лимфатических узла, сделав предварительно разрез кожи [14]. Через месяц проводили повторную инъекцию тем же количеством РНК-полимеразы, но без адьюванта и в большем объеме физиологического раствора: 0,2 мл вводили внутривенно, 0,4 мл внутримышечно (передняя лапа) и 0,4 мл в область одного из подколенных лимфатических узлов, не вскрывая кожи. Кровь начинали брать из краевой вены уха по 40—50 мл через 8 сут после второго введения антигена 5—6 раз через день. Концентрация антител в сыворотке составляла не менее 1—2 мг/мл. Чистый гамма-глобулин получали осаждением 40% сульфатом аммония и пропусканием через DEAE-целлюлозу. 0,1 мл раствора гамма-глобулина осаждает 25 мкг РНК-полимеразы.

Получение меченых клеток. Клетки *E. coli* K12, *S. marcescens* (W-203, Winkler U.) и *P. mirabilis* (PZ-124, Böhme H.) выращивали на среде M9 [15] с [^{14}C]гидролизатом белка хлореллы (1 мКи на 100 мл культуры, до $5 \cdot 10^8$ клеток/мл), осаждали центрифугированием, промывали буфером А (0,01 М трис-НСl (рН 8,0), 0,01 М MgCl_2 , 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит) и хранили при -15° .

Выделение [^{14}C]- α -субъединицы. Меченые клетки (100 мг сырого веса) суспендировали в 0,3 мл буфера А и разрушали в течение 3 мин на ультразвуковом дезинтеграторе MSE с охлаждением в ледяной бане. Суспензию центрифугировали при 20 000g 20 мин. Надосадочную жидкость доводили до 1 мл буфером А и концентрированным раствором NaCl до 0,5 М. После этого добавляли 30 мкг немеченого минимального фермента *E. coli* В и 0,3 мл раствора гамма-глобулина. Смесь оставляли на ночь при 4°. Преципитат отделяли центрифугированием и промывали физиологическим раствором (2 × 0,5 мл) и 0,5 мл физиологического раствора, содержащего 2 М мочевины.

Для получения α -субъединицы к преципитату добавляли 5 мг минимальной РНК-полимеразы *E. coli* и смесь растворяли в 1,5 мл буфера D. Раствор инкубировали 1 ч при 30° и наносили на колонку (1,5 × 100 см) с сефадексом G-200, уравновешенную буфером, содержащим 6 М мочевины, 0,1 М трис-HCl (рН 7,9), 0,2 М KCl. Фракцию II, содержащую α -субъединицу, обессоливали на колонке (2 × 20 см) с сефадексом G-15 и лиофилизовали.

Триптический гидролиз смеси α -субъединиц различных РНК-полимераз. К меченой α -субъединице ((1—5) · 10⁶ имп/мин) добавляли 900 мкг немеченой α -субъединицы *E. coli* В, растворяли в 1 мл 0,3 М аммоний-бикарбонатного буфера, рН 8,3. Ячейку продували азотом, раствор термостатировали при 37°, добавляли 50 мкг трипсина тремя порциями через 1,5 ч. Через 5 ч гидролиз останавливали замораживанием раствора, затем гидролизат лиофилизовали.

Получение пептидных карт. На пластинку с тонким слоем целлюлозы MN-300 (2 г целлюлозы на пластинку 20 × 20 см) наносили 150—200 мкг смеси триптических пептидов. Электрофорез проводили в пиридин-ацетатном буфере, рН 5,4 (70 мл пиридина, 25 мл уксусной кислоты, 405 мл воды) в течение 4 ч (500 В, 50—90 МА) при температуре 1—2°. Пластинку высушивали и проявляли в перпендикулярном направлении в системе пиридин — уксусная кислота — бутанол — Н₂O (10 : 3 : 15 : 12). После высушивания пластинку обрабатывали 0,2% раствором нингидрина в ацетоне. Для получения автордиограммы на пластинку накладывали рентгеновскую пленку РТ-1, прижимали ее сверху стеклянной пластинкой и выдерживали в темноте 3—8 сут. Пленку обрабатывали стандартным проявителем.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову и члену-кор. АН СССР Р. В. Хесину за ценные замечания при обсуждении данной работы, Э. С. Каляевой за помощь в работе с бактериями, О. Н. Данилевской за предоставление мутантных штаммов и Р. Н. Сияковой за получение иммунных сывороток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lill U. J., Behrendt E. M., Hartmann G. R. (1975) Eur. J. Biochem., 52, 411—420.
2. Иммунохимический анализ (1968) (под ред. Зильбер Л. А.), с. 99—119, «Медицина», М.
3. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V. (1967) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 28, 815—820.
4. Данилевская О. Н., Басс И. А., Вельков В. В., Горленко Ж. М., Ильина Т. С., Миндлин С. З., Хесля Р. Б. (1973) Проблемы регуляции обмена веществ у микроорганизмов, с. 21—33, Пуцково-на-Оке.
5. Cocks G. T., Wilson A. G. (1972) J. Bacteriol., 110, 793—802.
6. Li S. L., Yanofsky C. (1972) J. Biol. Chem., 247, 1031—1037.
7. Greighton T. E., Helinski D. R., Somerville R. L., Yanofsky C. (1966) J. Bacteriol., 91, 1819—1826.
8. McQuade III, J. F., Greighton T. E. (1970) Eur. J. Biochem., 16, 199—207.
9. Brenner D. J., Falkow S. (1971) Advances Genet., 6, 81—118.
10. Kimura M., Ohta T. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 2848—2852.
11. Nikiforov V. G. (1971) FEBS Lett., 16, 74—76.
12. Chothia C., Janin J. (1975) Nature, 256, 705—708.
13. Burgess R. R. (1969) J. Biol. Chem., 244, 6160—6167.
14. Гусев А. И., Язова А. К. (1970) Бюл. эксперим. биол., 78, № 4, 120—124.
15. Адамс М. (1961) Бактериофаги, с. 394, Изд-во иностр. лит., М.

Поступила в редакцию
1.III.1976

COMPARISON OF PEPTIDE MAPS OF α -SUBUNITS OF THE RNA
POLYMERASES FROM MICROORGANISMS OF *ENTEROBACTEREACEAE*
FAMILY

LIPKIN V. M., MODYANOV N. N., KOCHERGINSKAYA S. A.,
CHERTOV O. Yu., NIKIFOROV V. G., LEBEDEV A. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, §
Academy of Sciences of the USSR, Moscow; I. V. Kurchatov
Institute of Atomic Energy, Moscow*

Peptide composition of tryptic digest of the RNA polymerase α -subunits from *E. coli* K 12, *Serratia mercrescens*, and *Proteus mirabilis* has been compared to that from *E. coli* B. ^{14}C -labeled α -subunits of the enzymes obtained from the cell extracts by precipitation with antiserum against *E. coli* B core enzyme were hydrolyzed in the presence of a large excess of non-labeled α -subunit of the *E. coli* B RNA polymerase. The peptides obtained were separated by thin layer chromatography on cellulose. The labeled and non-labeled peptides were detected by autoradiography and ninhydrin staining, respectively. This approach provides a reliable comparison of the peptide maps of proteins hydrolyzed and chromatographed under identical conditions, whereby only microgram amounts of radioactive compounds are needed. Peptide maps of the *E. coli* B, *E. coli* K12, and *S. marcescens* were found to be identical whilst slight differences were observed with *P. mirabilis*. This finding suggests that the α -subunit of the RNA polymerase is an evolutionary conservative protein.
