



УДК 547.96.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА β -СУБЪЕДИНИЦЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ИЗ *E. COLI*I. ОГРАНИЧЕННЫЙ ТРИПТИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ β -СУБЪЕДИНИЦЫМарченко Т. В., Модянов Н. Н., Липкин В. М.,
Овчинников Ю. А.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Исследовано действие протеолитических ферментов на β -субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы с целью нахождения условий ее ограниченного протеолиза. Найдено, что гидролиз β -субъединицы трипсином при температуре 0°С, фермент-субстратном соотношении 1:500 в течение 4 ч приводит к образованию пяти крупных фрагментов с M 62 000, 52 000, 37 000, 24 000 и 10 000. Проведено препаративное расщепление β -субъединицы в указанных условиях. Полученный гидролизат гель-фильтрацией на сефадексе G-100 разделен на 10 фракций. Показано, что гидролизат наряду с пятью крупными фрагментами содержит 90–95 более мелких пептидов, большинство из которых присутствуют в незначительных количествах.

Фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза (пуклеозидтрифосфат: РНК-нуклеотидилтрансфераза; КФ 2.7.7.6) осуществляет транскрипцию генетической информации. Многостадийность процесса транскрипции и разнообразие механизмов его регуляции определяют сложность структуры и разнообразие механизмов его регуляции определяющей сложность структуры. Ранее нами была определена первичная структура α -субъединицы [2]. Настоящее сообщение является первым в серии статей, посвященных изучению первичной структуры β -субъединицы. Известно, что β -субъединица участвует в формировании центров связывания субстратов, а также во взаимодействии с антибиотиками рифампицином и стрептолидигином — ингибиторами синтеза РНК, действующими на стадии элонгации [4]. Изучение первичной структуры столь крупной белковой молекулы представляет несомненный интерес также и с точки зрения методологии.

Для выяснения роли отдельных субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы в процессе транскрипции и детального изучения физико-химических основ функционирования фермента необходимо знание его структуры. Ранее нами была определена первичная структура α -субъединицы [2]. Настоящее сообщение является первым в серии статей, посвященных изучению первичной структуры β -субъединицы. Известно, что β -субъединица участвует в формировании центров связывания субстратов, а также во взаимодействии с антибиотиками рифампицином и стрептолидигином — ингибиторами синтеза РНК, действующими на стадии элонгации [4]. Изучение первичной структуры столь крупной белковой молекулы представляет несомненный интерес также и с точки зрения методологии.

В последние годы завершено определение аминокислотных последовательностей ряда больших белков, среди которых гликогенфосфорилаза мышц кролика (841 аминокислотный остаток, M 97 412) [5] и β -галактозидаза *E. coli* (1021 аминокислотный остаток, M 116 248) [6]. Работа с этими белками была сопряжена с большими трудностями, прежде всего

в разделении сложных пептидных смесей, образующихся при расщеплении белковых молекул традиционными методами. Исследуемая нами β -субъединица содержит ~ 1400 аминокислотных остатков, в том числе 74 остатка лизина и 88 остатков аргинина [7]. При исчерпывающем триптическом гидролизе белка должно образоваться более 160 пептидов. Полное разделение такой смеси — задача весьма сложная. Не менее трудоемко разделение смеси более 30 крупных пептидов, получаемых при расщеплении β -субъединицы по остаткам метионина. Таким образом, определение аминокислотной последовательности β -субъединицы требует разработки специальных методических приемов как для расщепления белка, так и для разделения образовавшихся смесей пептидов.

Один из приемов при определении структуры крупных белков заключается в первоначальном расщеплении молекулы на небольшое число фрагментов с последующим исследованием их строения обычными методами, т. е. в сведении одной сложной задачи к нескольким более простым. Этот подход предусматривает подбор специфических условий, при которых ферменты или химические реагенты расщепляют полипептидную цепь только по некоторым, наиболее лабильным связям. Для исследования структурных и функциональных свойств ряда белков широко используется метод ограниченного протеолиза нативных белковых молекул [8—11]. Так, например, при изучении первичной структуры фактора элонгации EF-G из *E. coli* успешно был применен ограниченный триниснолиз, при котором образуется несколько сравнительно устойчивых к действию трипсина фрагментов [12]. Полученный нами препарат β -субъединицы РНК-полимеразы нельзя считать нативным белком из-за нестабильности β -субъединицы в присутствии денатурирующих агентов, в частности в присутствии мочевины, используемой в процессе выделения. Тем не менее нами была проведена серия экспериментов по поиску условий для ограниченного протеолиза β -субъединицы. С этой целью исследовалась возможность использования таких ферментов, как трипсин, субтилизин, пепсин, стафилококковая протеаза, катепсин D; варьировались соотношения фермента и субстрата, температура, время гидролиза. Наилучшие результаты были получены при ограниченном триптическом гидролизе. Оказалось возможным расщепить ограниченное число связей с образованием относительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина фрагментов.

Аналитические опыты по ограниченному триптическому гидролизу проводились в 0,3 М бикарбонате аммония (рН 8,5), получаемую смесь анализировали с помощью электрофореза в 5%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Было показано, что при 0°С и соотношении фермент — субстрат 1:1000—1:200 гидролиз протекает относительно медленно и результаты хорошо воспроизводятся. При соотношении фермент — субстрат 1:1000 первоначальная фрагментация белка происходит с образованием полипептидов T_1 и T_2 (рис. 1а), по истечении 2 ч в гидролизате преобладает фрагмент T_2 с M 62 000 (молекулярный вес фрагментов определяли методом гель-электрофореза [13]), с увеличением времени гидролиза образуются фрагменты T_3 (M 52 000), T_4 (M 37 000), T_5 (M 24 000), T_6 (M 10 000) и ряд более мелких пептидов, а фрагмент T_1 расщепляется полностью. При увеличении нагрузки фермента (E/S 1:200, рис. 1б) происходит быстрая деградация фрагмента T_2 с образованием фрагментов T_4 и T_5 . По мере уменьшения количества фрагмента T_1 увеличивается содержание фрагмента T_3 . Через 4 ч после начала гидролиза фрагменты T_3 , T_4 и T_5 преобладают в гидролизате. При увеличении времени инкубирования эти фрагменты постепенно гидролизуются с образованием более мелких пептидов.

При гидролизе β -субъединицы трипсином при температуре 0°С и фермент-субстратном соотношении 1:500 в течение 4 ч образуется оптимальный набор крупных фрагментов (T_2 , T_3 , T_4 , T_5 и T_6 с M 62 000, 52 000, 37 000, 24 000 и 10 000) (рис. 1б). В гидролизате присутствует также смесь

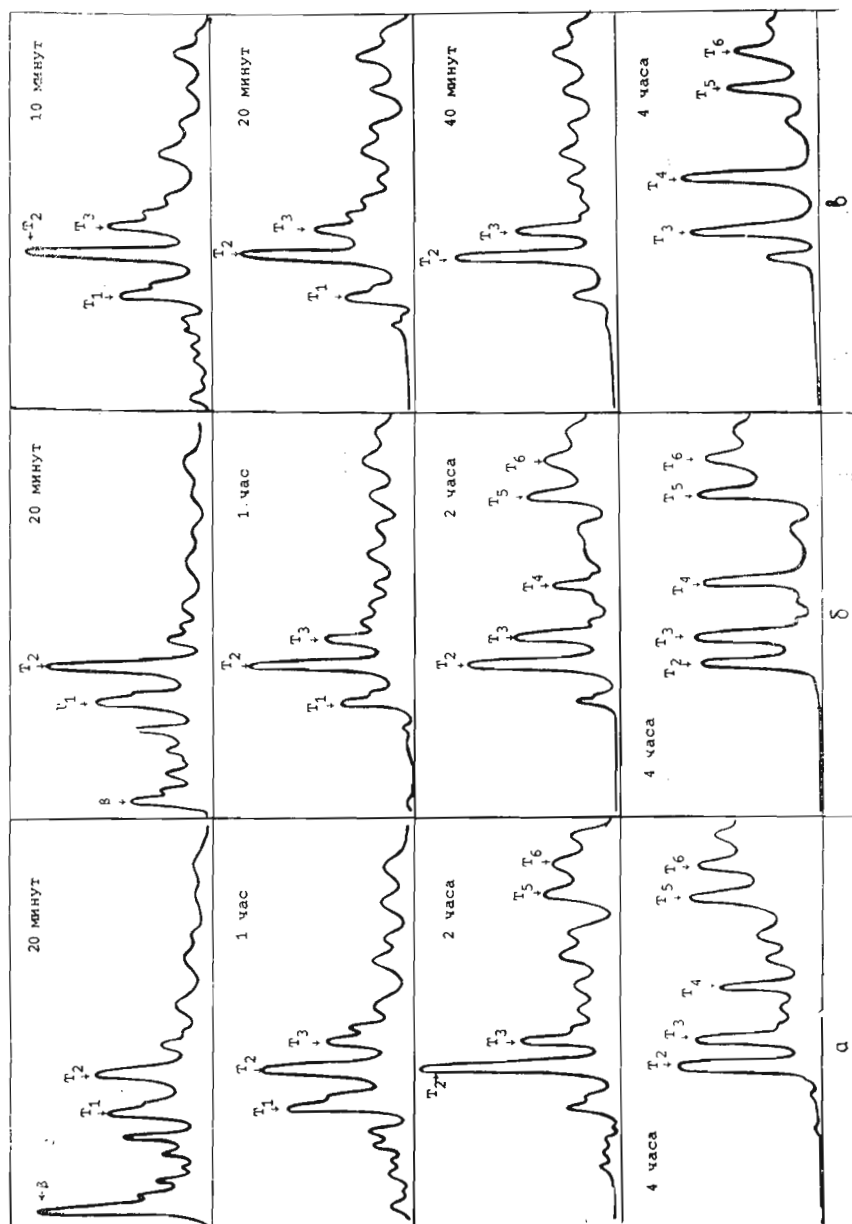


Рис. 1. Гель-электрофорез в 5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы при соотношениях фермента и субстрата 1:1000 (а), 1:500 (б) и 1:200 (в).

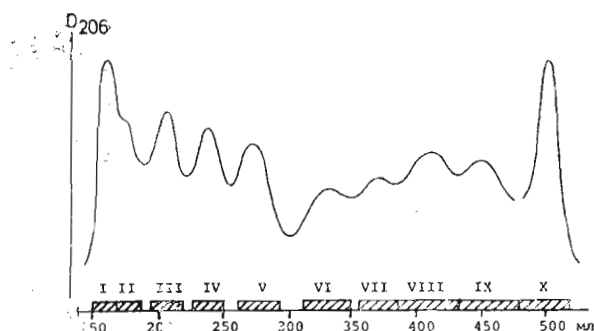


Рис. 2. Разделение продуктов ограниченного триптического гидролиза β -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* на сефадексе G-100. Отмечены границы объединения фракций

более мелких пептидов. Последние условия были выбраны для препаративного расщепления 3,2 мкмоль (0,5 г) β -субъединицы.

Первоначальное разделение полученного гидролизата проводили с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 в присутствии 6 М хлоргидрата гуанидина. В результате было получено 10 объединенных фракций (рис. 2). Состав фракций анализировали методом электрофореза в 5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия или с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии мочевины (рис. 3), а также методом пептидных карт (рис. 4). Как показал анализ, упомянутые выше крупные пептиды содержатся во фракциях I—III. Фракция I содержит основное количество двух самых крупных фрагментов T_2 и T_3 (M 62 000 и 52 000), а также незначительные количества минорного фрагмента (M 45 000) и фрагмента T_4 (M 37 000) (рис. 3). Фракция II обогащена фрагментом T_3 по сравнению с фракцией I. Два полипептида с M 24 000 и 10 000 (T_5 и T_6) содержатся во фракции III. Фракции IV и V содержат по 5—6 фрагментов с M 6000—9000. При анализе фракции VI было показано наличие в ней четырех пептидов (M 4000—6000), два из которых преобладают в смеси. Как видно из электрофореграммы (рис. 3), фракция VII содержит четыре фрагмента с M 2000—4000, не считая небольших примесей минорных компонентов. На пептидной карте фракции VII (рис. 4а) видно 6 пятен, соответствующих коротким пептидам, а также интенсивно окрашенное пятно в точке нанесения, что подтверждает наличие в смеси более крупных фрагментов, обнаруженных методом электрофореза в полиакриламидном геле. При анализе фракции VIII электрофорезом в полиакриламидном геле было найдено 4 фрагмента. На пептидной карте этой фракции видно 20 пятен (рис. 4б). Как выяснилось в процессе структурных исследований, каждый пептид фракции VIII содержал от 10 до 20 аминокислотных остатков. Число пятен (~ 25) на пептидной карте фракции IX (рис. 4в) оказалось меньше реального числа пептидов (45), выделенных из этой фракции [14]. Это обстоятельство объясняется тем, что многие из пептидов, образованные вследствие частичного расщепления связей при ограниченном трипсинолизе, присутствовали в смеси в незначительных количествах и не проявлялись на пептидных картах. Из последней, X фракции было выделено 8 коротких пептидов, содержащих от 2 до 5 аминокислотных остатков [14]. Пептидная карта фракции X представлена на рис. 4г.

Проведенный анализ фракций свидетельствует о наличии в гидролизате β -субъединицы около 100 пептидов. Учитывая тот факт, что некоторые фрагменты были обнаружены одновременно в двух соседних фракциях, можно считать, что реальное число расщепленных связей составило около половины всех связей, расщепляемых при исчерпывающем триптическом гидролизе. В то же время большинство пептидов, особенно низкомолекулярных, присутствовало в гидролизате в незначительных количествах,

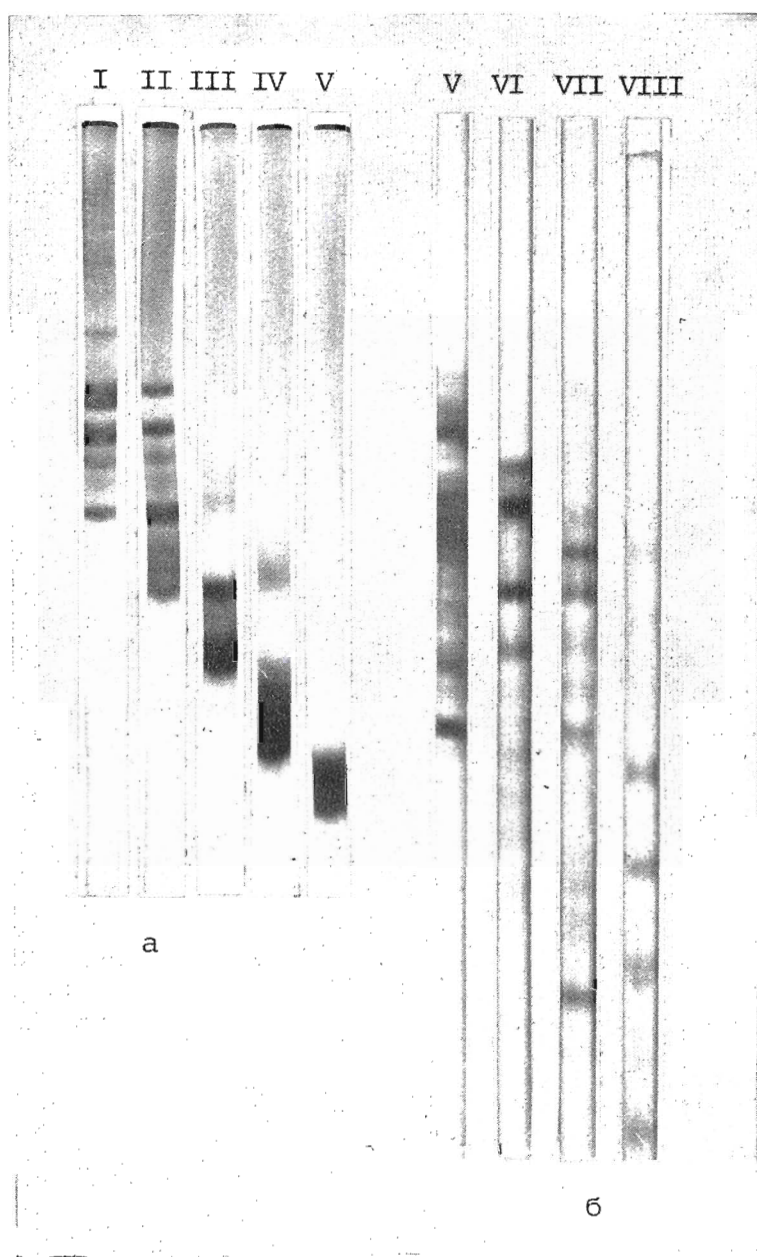


Рис. 3. Электрофореграммы фракций I–VIII триптического гидролизата β -субъединицы в 5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (а) и в 15% полиакриламидном геле в присутствии мочевины (б)

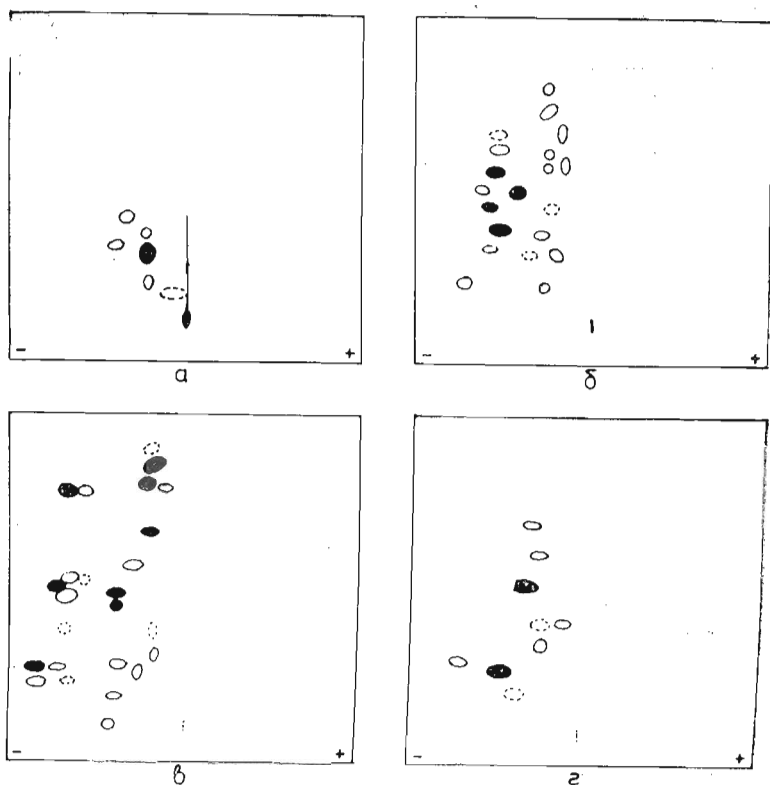


Рис. 4. Пептидные карты фракций VII (а), VIII (б), IX (в) и X (г) триптического гидролизата β -субъединицы

поскольку эти пептиды являлись продуктами дальнейшего расщепления крупных фрагментов, образовавшихся в результате первичного ограниченного протеолиза β -субъединицы. Сравнительная неустойчивость этих крупных фрагментов, вероятно, обусловлена частичной денатурацией β -субъединицы в процессе ее выделения. Тем не менее изучение структур полученных пептидов несомненно позволит получить ценную информацию как об аминокислотной последовательности отдельных участков полипептидной цепи, так и об общей архитектуре β -субъединицы.

Экспериментальная часть

В работе использованы сефадексы G-10, G-100 (Pharmacia, Швеция), трипсин, обработанный TPCK (Worthington, США), трис (Calbiochem, США), β -меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), хлоридат гуанидина (Pierce, США), реактивы для диск-электрофореза (Bio-Rad, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч. Для изготовления пептидных карт использовали целлюлозные пластинки G-1440, 20×20 см (Schleicher und Schüll, ФРГ).

Выделение β -субъединицы. В основу препаративного метода выделения β -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* была положена методика Хартмана [15], которая заключается в разделении α , β и β' -субъединиц на фосфоцеллюлозе Р-11.

Ограниченный триптический гидролиз β -субъединицы. а) Аналитические опыты. β -Субъединицу (5 мг) растворяли в 0,8 мл буферного раствора А, содержащего 0,01 М трис-HCl, 0,01 М $MgCl_2$, 0,1 мМ EDTA, 0,1 М KCl, 10 мМ дитиотреит, 8 М мочевины (pH 8,5). Раствор β -субъединицы диализовали 12 ч против 500 мл 0,3 М NH_4HCO_3 . Затем объем раствора

доводили 0,3 М NH_4HCO_3 до 1 мл. Аликвоты по 50 мкл инкубировали с трипсином при 0°С (соотношения фермент — субстрат 1:1000, 1:500 и 1:200). Через определенные промежутки времени образцы замораживали, подвергали лиофилизации и анализировали электрофорезом в 5% полиакриламидном геле (см. ниже).

б) *Препаративный гидролиз*. 500 мг (3,2 мкмоль) β -субъединицы растворяли в 80 мл буферного раствора А и диализовали 12 ч против 10 л 0,3 М NH_4HCO_3 (рН 8,5). Затем объем раствора довели до 100 мл 0,3 М NH_4HCO_3 и добавляли 1 мг трипсина в 40 мл 0,3 М NH_4HCO_3 (соотношение фермент — субстрат 1:500). Смесь инкубировали 4 ч при 0°С, добавляли 10 мкл динизопропилфторфосфата и лиофилизовали.

Разделение продуктов ограниченного триптического гидролиза. 100 мг триптического гидролизата β -субъединицы в 3 мл буферного раствора, содержащего 0,05 М трис-НСl, 1% β -меркаптоэтанол, 6 М хлоргидрат гуанидина (рН 8,0), наносили на колонку (2×200 см) с сефадексом G-100, уравновешенным 0,05 М трис-НСl-буфером (рН 8,0), содержащим 1 мМ β -меркаптоэтанол, 6 М хлоргидрат гуанидина, и элюировали тем же раствором со скоростью 5 мл/ч. Объединенные фракции обессоливали на колонке с сефадексом G-10, уравновешенным слабым раствором аммиака (рН 10,0), и лиофилизовали.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез в 5% полиакриламидном геле проводили в присутствии додецилсульфата натрия по Веберу и Осборн [13], а электрофорез в 15% полиакриламидном геле — в присутствии мочевины [16]. Гели сканировались на спектрофотометре Gilford-2400.

Молекулярный вес фрагментов, образованных при ограниченном трипсинолизе β -субъединицы, определяли методом гель-электрофореза [13], используя в качестве стандартов цитохром с, M 12 400 (Serva, ФРГ), миоглобин, M 17 800 (Serva, ФРГ), химотрипсиноген А, M 25 000 (Serva, ФРГ), пепсин, M 35 000 (Worthington, США), яичный альбумин, M 45 000 (Serva, ФРГ), бычий сывороточный альбумин, M 67 000 (Serva, ФРГ).

Пептидные карты получали на пластинках с тонким слоем целлюлозы. Электрофорез проводили при рН 6,5 в пиридин-ацетатном буфере (пиридин — уксусная кислота — вода, 25:1:225) при напряжении 1200 В и температуре 1–2°С в течение 30 мин. Для хроматографии в перпендикулярном направлении использовали систему *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода, 15:3:10:12. Для обнаружения пептидов карты обрабатывали 0,2% раствором нингидрина в ацетоне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chamberlin M. J. (1976) in: RNA Polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds), pp. 17–67, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
2. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V. (1977) FEBS Lett., 76, 108–111.
3. Burgess R. R. (1969) J. Biol. Chem., 244, 6168–6176.
4. Zillig W., Palm P., Heil A. (1976) in: RNA Polymerase (Losick R., Chamberlin M., eds), pp. 101–125, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
5. Titani K., Koide A., Hermann J., Ericsson L. H., Kumar S., Wade R. D., Walsh K. A., Neurath H., Fisher E. H. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 4762–4766.
6. Fowler A. V., Zabin I. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 1507–1510.
7. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. (1978) Биосрган. химия, 4, 158–179.
8. Reed R. G., Feldhoff R. C., Clute O. L., Theodore P., Jr. (1975) Biochemistry, 14, 4578–4583.
9. Arai K., Nakamura S., Arai F., Kawakita M., Kaziro Y. (1976) J. Biochem., 79, 69–83.
10. Gullic W. J., Herries D. G., Wood E. J. (1979) Biochem. J., 179, 593–602.
11. Siezen R. J., Hoenders H. J. (1979) Eur J. Biochem., 96, 431–440.
12. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгrevиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. (1977) Биосрган. химия, 3, 1333–1345.

13. Weber K., Osborn M. (1963) J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
14. Липкин В. М., Марченко Т. В., Хохряков В. С., Половникова И. Н., Потапенко Н. А., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. (1980) Биоорг. химия, 6, 332-347.
15. Lill U. J., Behrendt E. M., Hartmann G. R. (1975) Eur. J. Biochem., 52, 411-420.
16. Panyim S. A., Chalkley R. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., 130, 337-346.

Поступила в редакцию
12.XI.1979

**PRIMARY STRUCTURE OF THE β -SUBUNIT OF *E. COLI*
DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE. I. LIMITED TRYPTIC
HYDROLYSIS OF THE β -SUBUNIT**

MARCHENKO T. V., MODYANOV N. N., LIPKIN V. M., OVCHINNIKOV Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The action of proteolytic enzymes on the β -subunit of DNA-dependent RNA polymerase was examined with the purpose of finding the conditions of its limited proteolysis. The trypsin digestion (4 hours at 0° C and enzyme-substrate ratio of 1:500) gave rise to five large fragments of *M* 62 000, 52 000, 37 000, 24 000, and 10 000. The cleavage of the β -subunit in the aforementioned conditions was performed on a preparative scale. The hydrolysate was resolved into 10 fractions by gel filtration on Sephadex G-100. Analysis of the hydrolysate showed that, apart from 5 large fragments, it contains 90-95 shorter peptides, most of them in negligible amounts.
