



УДК 577.159.02

СУБЪЕДИНИЦЫ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. coli*,
КОНТАКТИРУЮЩИЕ С 5'-КОНЦОМ РНК НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ
ТРАНСКРИПЦИИ

Свердлов Е. Д., Царев С. А.

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

В процессе транскрипции образующийся продукт перемещается внутри транскрипционного комплекса, взаимодействуя на разных этапах с различными группами РНК-полимеразы. Ранее [1-3] мы разработали подход, позволяющий с помощью фотоаффинной модификации определить субъединицы РНК-полимеразы, контактирующие с 5'-концевой группой РНК на разных этапах синтеза, с использованием γ -азидоанилидов GTP и ATP. Мы показали, что в контактах с 5'-концевым звеном при синтезе РНК, иницируемом на промоторах P₀ и P_R [1, 3] фага λ , участвуют β -, β' - и σ -субъединицы, причем по мере удлинения продукта вклад σ -субъединицы непрерывно уменьшается. В настоящей работе описаны результаты, полученные при инициации синтеза РНК на промоторе P₀ фага λ фотореактивным динуклеотидом 5'-(*n*-азидоанилидо)фосфоцитидил(3'→5')уридином [(Az_n)pCpU, Az_n-*n*-N₂C₆H₄NH]. Использование в качестве иницирующего субстрата динуклеотида позволяет более строго контролировать длины синтезируемых продуктов и, следовательно, более детально исследовать различия в контактах субъединиц с продуктами на разных этапах синтеза РНК.

Динуклеотид pCpU и его 5'-*n*-азидоанилид были синтезированы по нашему заказу в Новосибирском государственном университете. Стандартная реакционная смесь синтеза РНК содержала в 20 мкл: 40 мМ трис-HCl (pH 8,0), 0,15 М KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ дитиотреит, 0,4 мМ K₂HPO₄, 4 мкг бычьего сывороточного альбумина (BSA), 1 мкг фрагмента *E. coli* ДНК фага *lim* 434 [5], 0,1 мМ (Az_n)pCpU, указанные в пояснениях к рисункам NTP 6 мкМ концентрации и 6 мкМ [α -³²P]NTP (350 Кн/ммоль, Amersham). К этой смеси добавляли 4 мкг РНК-полимеразы [4], инкубировали 5 мин при 37°С. Затем отбирали 5 мкл для двумерного разделения синтезируемых продуктов, а оставшееся 15 мкл облучали светом ртутной лампы СВД 12 А через светофильтр BC-4 ($\lambda > 290$ нм) в течение 2 мин, добавляли равный объем раствора, содержащего 3% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, прогревали 2 мин при 90°С и подвергали электрофорезу. Разделение продуктов на ацетатцеллюлозе и гомохроматографию выполняли по методу [6] в гомосмеси V. Электрофорез проводили в 6% полиакриламидном геле (20×20××0,15 см), содержащем 0,1 М натрий-фосфат и 0,05 М трис-борат (pH 7,5), 0,1% SDS. Электродный буфер — 0,05 М трис-борат (pH 8,3), 0,1% SDS. Электрофорез проводили 17 ч при 200 В до выхода бромфенолового синего из геля.

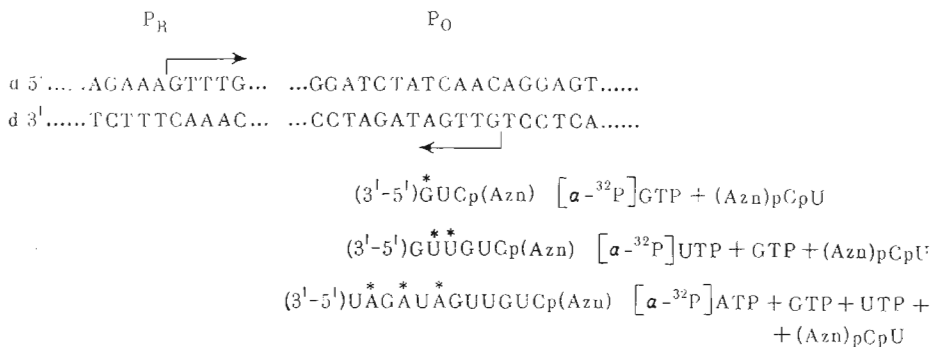


Рис. 1. Структуры промоторов P_R и P_O фага *limm 434* вблизи точек инициации синтеза РНК. Стрелками указаны начало и направление транскрипции. Приведены также продукты максимальной длины, образующиеся при использовании иницирующего фотореактивного динуклеотида $(Azn)pCpU$ с различными сочетаниями NTP, указанными справа. Звездочками в олигонуклеотидах отмечены радиоактивные звенья, включающиеся в результате синтеза

Используемый нами в качестве матрицы фрагмент ДНК фага *limm434* *E. coli*-G содержит два транскрибируемых *in vitro* промотора P_R и P_O [7]. Мы показали, что динуклеотид $pCpU$ и его фотореактивное производное в сочетании с GTP способны образовывать стабильный к рифампицину иницирующий комплекс. Используя различные комбинации NTP и $[\alpha-^{32}P]NTP$ с фотореактивной затравкой, можно синтезировать продукты разной длины (рис. 1). Анализ образующихся при этом олигонуклеотидов показывает, что при сочетании субстратов $(Azn)pCpU$ и $[\alpha-^{32}P]GTP$ образуется единственный меченый продукт $(Azn)pCpUpG$. При использовании в сочетании с $(Azn)pCpU$ двух нуклеозидтрифосфатов, GTP и $[\alpha-^{32}P]UTP$, синтезируются три меченых продукта: $(Azn)pCpUpGpU$, $(Azn)pCpUpGpUpU$ и $(Azn)pCpUpGpUpUpG$. Наконец, сочетание $(Azn)pCpU$ с тремя NTP (GTP, UTP и $[\alpha-^{32}P]ATP$) дает меченые продукты большей длины, чем в двух предыдущих случаях. Реакционную смесь после синтеза облучали, комплекс разрушали и субъединицы РНК-полимеразы разделяли в SDS-содержащем геле.

Благодаря тому что только продукты синтеза сочетают в себе свойства фотореактивности и радиоактивности, обнаружение радиоактивности, ассоциированной с субъединицами РНК-полимеразы после облучения должно быть обусловлено ковалентным присоединением продукта реакции. Результаты радиоавтографии гелей представлены на рис. 2а и б. В последнем случае электрофорез проводили дольше, чтобы получить более четкое разделение β - и β' -субъединиц. На рис. 2а можно видеть, что α -субъединица не метится ни в одном из случаев. Сочетание $(Azn)pCpU$ и $[\alpha-^{32}P]GTP$ приводит к появлению радиоактивности в β - и σ -субъединицах (рис. 2б, колонка 1). С комбинацией субстратов $(Azn)pCpU$, GTP и $[\alpha-^{32}P]UTP$ основной меченой субъединицей оказывается β -субъединица. Относительно меньше радиоактивности остается в σ -субъединице. Радиоактивность появляется также в β' -субъединице (рис. 2б, колонка 3). Наконец, в условиях синтеза более длинных продуктов мечеными оказываются только β - и β' -субъединицы. Контрольные опыты без фотореактивной затравки (рис. 2б, колонки 2, 4, 6) показывают, что модификация субъединиц обусловлена действительно продуктом синтеза. Эта модификация происходит внутри транскрипционного комплекса, поскольку альбумин, присутствующий в значительном избытке в реакционной смеси, оказывается немеченым. Кроме того, если комплекс разрушить перед облучением, то модификации субъединиц не происходит. Таким образом, β - и σ -субъединицы на начальных этапах, β - и β' - на последующих контактируют с синтезированным продуктом в транскрипционном комплексе. Ранее мы уже показали с другими фотореактивными субстратами, что как 5'-конце-

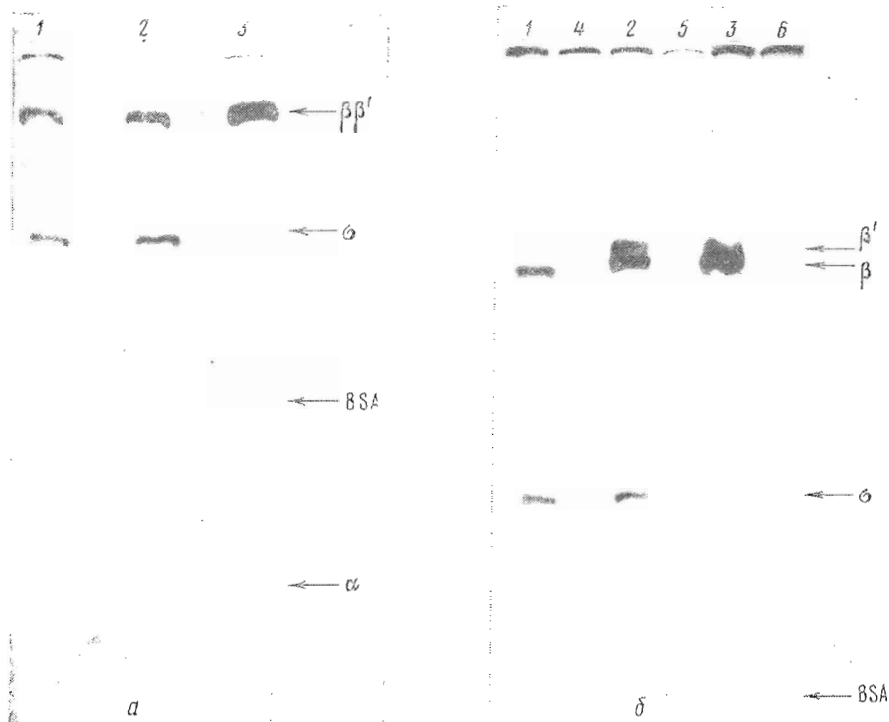


Рис. 2. Радиоавтограммы разделенных в SDS-содержащем геле (*a* — 17 ч, *b* — 24 ч) субъединиц РНК-полимеразы после облучения транскрипционного комплекса, образованного на *E. coli* R1-G-фрагменте в присутствии (Azn)рСрU в комбинации с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ (1), с GTP и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (2), с GTP, UTP и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3). Радиоавтограммы 4–6 отвечают разделению смесей, полученных аналогично 1–3, но в отсутствие (Azn)рСрU. Стрелками указаны положения $\beta\beta'$ -, σ -, α -субъединиц и BSA

вые [1, 3], так и 3'-концевые группы синтезирующегося продукта [2] на начальных этапах синтеза РНК контактируют с σ -субъединицей. На основании этих результатов мы предположили, что σ -субъединица непосредственно вовлечена в инициацию синтеза РНК и в формирование сайта связывания 3'-концевого звена продукта на начальных этапах специфического синтеза РНК. В настоящее время считается, что участок связывания иницирующего субстрата РНК-полимеразы после инициации синтеза РНК выполняет функции участка связывания 3'-концевой группы продукта синтеза и не меняется на всем протяжении синтеза РНК [9]. Участие σ -субъединицы в формировании участка связывания продукта на начальных этапах синтеза показывает, что этот участок должен меняться после инициации, так как σ -субъединица диссоциирует из транскрипционного комплекса, когда длина продукта достигает примерно 10 звеньев [8].

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание и помощь в выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сverdlov E. D., Tsarev S. A., Modyanov N. N., Lipkin V. M., Grachev M. A., Zaychikov E. F., Pletnev A. G. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 1278–1280.
2. Sverdlov E. D., Tsarev S. A., Levitan T. L., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Grachev M. A., Zaychikov E. F., Pletnev A. G., Ovchinnikov Yu. A. (1979) in: *Macromolecules in the Functioning Cell* (Salvatore F., Marino G., eds), pp. 149–158, Plenum Press, New York — London.
3. Sverdlov E. D., Tsarev S. A., Kuznetsova N. F. (1980) *FEBS Lett.*, in press.
4. Burgess R. R., Jendrisak J. (1975) *Biochemistry*, 14, 4634–4638.

5. Сverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Rostaпshov B. M. (1978) Биорган. химия, 4, 894—900.
6. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucl. Acids Res., 1, 331—353.
7. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Krayev A. S., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zacharyev V. M., Bayev A. A. (1979) Gene, 6, 235—249.
8. Krakow J. S., Fronk E. (1969) J. Biol. Chem., 224, 5988—5994.
9. Krakow J. S., Rhodes C., Jovin T. M. (1976) in: RNA Polymerase (Losic R., Chamberlin M., eds), pp. 127—157, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.

Поступило в редакцию
3.III.1980

***E. COLI* RNA POLYMERASE SUBUNITS CONTACTING RNA 5'-TERMINUS AT DIFFERENT STEPS OF TRANSCRIPTION**

SVERDLOV E. D., TSAREV S. A.

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

The synthesis of short ribooligonucleotides was accomplished with *E. coli* RNA polymerase using photoreactive pCpU 4-azidoanilide as a primer, a restriction promoter containing the *λ*imm 434 DNA fragment as a template, and different incomplete combinations of nucleoside triphosphates one of which was [α - 32 P]-labeled. After UV irradiation of the reaction mixture, σ and β subunits found in contact with the shortest synthesized oligonucleotides. With the length of oligonucleotides increasing, the contacts of σ subunit with the product diminish and new contacts with β' subunit appear.
