



УДК 577.159.048

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЦЕНТРА СВЯЗЫВАНИЯ
ИНИЦИИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА
ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. coli*
АДЕНОЗИН-5'-ТРИМЕТАФОСФАТОМ

Смирнов Ю. В., Литкин В. М., Овчинников Ю. А.

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

Грачев М. А., Мустаев А. А.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Биоспецифическая (аффинная) модификация — эффективный метод изучения многокомпонентных белковых систем. Ранее этот метод использовался для локализации в РНК-полимеразе участков, ответственных за связывание ДНК-матрицы и РНК-продукта [1—3]. Известно, что различные аналоги пуриновых нуклеотидов с заместителями по γ -фосфату могут выступать в качестве иницирующего субстрата для РНК-полимеразы [4]. Кнорре и сотр. [5, 6] обнаружили, что образующиеся в результате активации трифосфатной группы конденсирующими реагентами промежуточные соединения — нуклеозид-5'-триметафосфаты — являются активными фосфорилирующими агентами, реагирующими с широким кругом нуклеофилов; вместе с тем они быстро гидролизуются — для аденозин-5'-триметафосфата (АТМР) время полупревращения в АТР в воде при 15° С равно 7,5 мин [6]. В настоящем сообщении описано применение АТМР в качестве аффинного реагента для модификации центра связывания иницирующего субстрата РНК-полимеразы *E. coli*.

Нами проведено исследование кинетики инактивации РНК-полимеразы под действием АТМР в различных условиях. В качестве матрицы был взят *Bsp*-I-фрагмент ДНК фага Т7 (любезно предоставленный Е. Ф. Зайчиковым) [7, 8]. Из рис. 1 видно, что с ростом концентрации АТМР степень и скорость инактивации увеличиваются (ср. кривые 2 и 3), а АТР заметно защищает фермент от инактивации (кривая 1). В присутствии УТР наблюдается резкое увеличение скорости и полноты инактивации (кривая 4).

С использованием ³²P-меченного АТМР установлено, что он модифицирует РНК-полимеразу в комплексе фермента с фрагментом ДНК фага Т7. Если молекула АТМР в модифицированной РНК-полимеразе расположена в центре связывания иницирующего субстрата, она может сохранить способность образовывать фосфодиэфирную связь с субстратом, вошедшим в «элонгирующий» центр фермента. При электрофоретическом

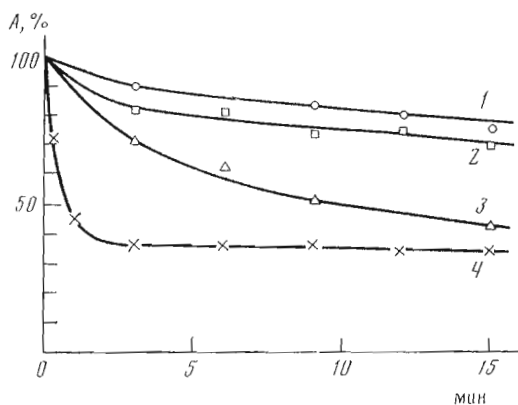


Рис. 1

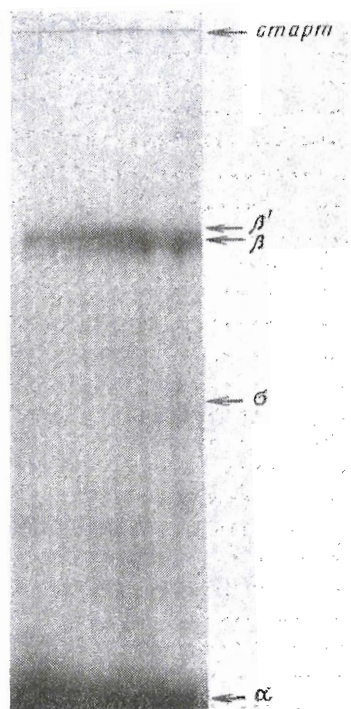


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика инактивации РНК-полимеразы под действием АТМР: 1 – 5 мМ АТР + 0,5 мМ АТМР, 2 – 0,1 мМ АТМР, 3 – 0,5 мМ АТМР, 4 – 0,1 мМ УТР + 0,1 мМ АТМР. 6 пмоль промотерсодержащего фрагмента ДНК фага Т7 [8] и 12 пмоль РНК-полимеразы в 100 мкл буфера А, содержащего 0,04 М трис-НСl (рН 7,9), 0,05 М NaCl, 0,01 М MgCl₂, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит, а также в указанных случаях АТР и УТР, выдерживали 6 мин при 37° С, охлаждали до 20° С и добавляли АТМР в виде 10 мМ метанольного раствора. Аликвоты (10 мкл) отбирали через указанные промежутки времени и добавляли к 40 мкл смеси NTP (концентрация каждого 0,12 мМ; УТР; ¹⁴С-меченный) в буфере А. Через 5 мин инкубации при 37° С определяли радиоактивность кислотонерастворимой фракции, которая и служила мерой активности фермента. Ордината – активность РНК-полимеразы в процентах от исходной

Рис. 2. Радиоавтограф геля-электрофореграммы РНК-полимеразы, модифицированной АТМР с последующим добавлением [³²P]УТР на матрице poly[d(A—T)]. 10 пмоль РНК-полимеразы и 1,5 мкг poly[d(A—T)] в 12 мкл буфера А (см. рис. 1) инкубировали 5 мин при 37° С, охлаждали до 20° С и добавляли 1 мкл 10 мМ АТМР в диметилсульфоксиде. Через 30 мин добавляли 8 мкл водного раствора [³²P]УТР (100 Ки/ммоль) и затем через 1 мин – равный объем смеси 3% додецилсульфата натрия, 5% меркаптоэтанол, 10% глицерина. Далее смесь напосили на полиакриламидный гель (6%) и проводили электрофорез как в работе [3]. Стрелками показаны положения субъединиц по данным окраски кумасси G-250. α-Субъединица мигрирует за пределы геля

разделены в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия РНК-полимеразы, модифицированной нерадиоактивным АТМР с добавлением [³²P]УТР (рис. 2) показано, что радиоактивная метка локализована в β-субъединице. Из данных электрофореза на ацетате целлюлозы в 8 М мочеvine [9] также следует, что радиоактивно метится только β-субъединица, а остальные субъединицы остаются при этом нерадиоактивными (рис. 3). В отсутствие матрицы, фермента или при замене АТМР на АТР радиоактивная метка в наших условиях в РНК-полимеразу не включалась.

Таким образом, использование радиоактивного УТР в сочетании с реакционноспособным АТМР позволяет специфически пометить в РНК-по-

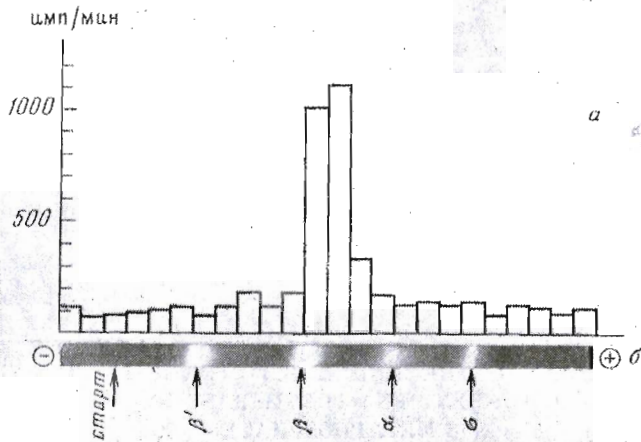


Рис. 3. а – Распределение радиоактивности при электрофорезе РНК-полимеразы, модифицированной АТМР с последующим добавлением $[5,6-^3\text{H}]\text{УТР}$, на ацетате целлюлозы в 8 М мочевины [9]. 1,6 нмоль РНК-полимеразы и 0,3 мг высокополимерной ДНК из тмуса теленка в 0,7 мл буфера А инкубировали 10 мин при 37°C , охлаждали до 20°C и добавляли 5 мкл 50 мМ АТМР в диметилсульфоксиде. Через 30 мин добавляли 10 мкл водного раствора $[5,6-^3\text{H}]\text{УТР}$ (1,49 Кп/ммоль) и отделяли РНК-полимеразу от ДНК и низкомолекулярных компонентов смеси на колонке биогеля А-5м ($0,5 \times 50$ см). Обессоленный и лиофилизированный препарат модифицированной РНК-полимеразы в аммоний-боратном буфере с 8 М мочевиной (рН 8,9) наносили на полоску ацетата целлюлозы ($3 \times 17 \times 0,01$ см), уравновешенную тем же буфером. Электрофорез проводили в течение 4 ч (600 В, 60 мА). Из средней части полоски ацетата целлюлозы вырезали кусочки по 5 мм длиной и просчитывали в сцинтилляторе «Unisolve». б – Обнаружение амидочерным 10В; приведен негативный отпечаток

лимеразном комплексе центр связывания иницирующего нуклеозид-5'-трифосфата, поскольку неспецифично связанные молекулы АТМР не могут образовать с УТР межнуклеотидной связи. Подобный прием был использован ранее для локализации в РНК-полимеразном комплексе участка связывания РНК-продукта [2, 3]. Образующийся короткий транскрипт

предположительного строения rrrArU^* , ковалентно связанный с β -субъединицей РНК-полимеразы, по-видимому, не способен к транслокации, что и является причиной ингибирующего действия АТМР. В настоящее время проводится выделение модифицированных пептидов β -субъединицы с целью структурной локализации центра связывания АТМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г., Скиба П. П., Липкин В. М., Модянов Н. Н. Ковалентное связывание РНК-полимеразы *E. coli* с фоточувствительными аналогами декатамидиловой кислоты. – Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1410–1421.
2. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Пастухов А. Г. Фотоаффинная модификация РНК-полимеразы *E. coli* в транскрипционном комплексе аналогами субстратов. – Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1278–1280.
3. Свердлов Е. Д., Царев С. А. Субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*, контактирующие с 5'-концом РНК на разных стадиях транскрипции. – Биоорг. химия, 1978, т. 6, № 7, с. 1110–1113.
4. Chamberlin M. J. RNA polymerase — an overview. — In: RNA polymerase / Losick R., Chamberlin M., eds. Cold Spring Harbor Laboratory, 1976, p. 17–67.
5. Бабкина Г. Т., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кнорре Д. Г., Ковригина В. С. Активное фосфорилирующее соединение в реакции нуклеозид-5'-трифосфатов с водорастворимым карбодимидом. — Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1975, вып. 3, с. 128–132.
6. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Негесов С. В. Накопление и гидролиз циклического адепозин-5'-триметафосфата в реакции адепозин-5'-трифосфата

- с N-циклогексил, N'-β-(4-метилморфолиний)-этилкарбодимидом в водном растворе.— Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим., 1976, № 2, вып. 1, с. 117—123.
7. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. Выделение промоторных и терминаторного фрагментов ДНК фага T7 из гидролизата, полученного действием эндонуклеазы рестрикции *Bsu* R.— Докл. АН СССР, 1978, т. 239, № 2, с. 475—478.
8. Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. Нуклеотидная последовательность промоторного участка A₀ ДНК фага T7.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 8, с. 1268—1271.
9. Fujiki H., Zurek G. The subunits of DNA-dependent RNA-polymerase from *E. coli*. I. Amino acid analysis and primary structure of the N-terminal regions.— FEBS Lett., 1975, v. 55, № 1, p. 242—244.

Поступило в редакцию
9.III.1981

AFFINITY LABELING OF THE BINDING SITE FOR INITIATING SUBSTRATE IN *E. coli* DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE BY ADENOSINE 5'-TRI- METAPHOSPHATE

SMIRNOV Yu. V., LIPKIN V. M., OVCHINNIKOV Yu. A., GRACHEV M. A.,
MUSTAEV A. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow; Novosibirsk Institutz of Organic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Cyclic adenosine-5'-trimetaphosphate in combination with radioactive UTP was used for the specific labeling of the binding site of initiating nucleoside-5'-triphosphate in the complex of RNA polymerase—DNA matrix. The covalent attachment of the radioactive label to β-subunit was found under these conditions.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.04.81. Подписано к печати 04.06.81 Т-08482 Формат бумаги 70×108^{1/16}
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0 + 2 вкл. Усл. кр.-отт. 13,2 тыс. Уч.-изд. л. 16,0 Бум. л. 5,0
Тираж 903 экз. Зак. 381

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 121699. Москва, Шубинский пер., 10