



УДК 577.412.855

ИЗУЧЕНИЕ ТИПА КОВАЛЕНТНОЙ СВЯЗИ  
В ПРИРОДНОМ СОЕДИНЕНИИ БЕЛКА А \* БАКТЕРИОФАГА  $\phi$ X174  
С НУКЛЕОТИДАМИ

Золотухин А. С., Дрыгин Ю. Ф., Богданов А. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского

Из клеток, зараженных фагом  $\phi$ X 174 в среде, содержащей [ $^{32}$ P]ортофосфат, выделен белок А\*, связанный с  $^{32}$ P-меткой. Обработкой фосфодиэстеразой змеяного яда [ $^{32}$ P]пептидов, образующихся при гидролизе белка проназой, показано, что с белком фосфодиэфирной связью соединен нуклеотидный материал состава А, G. Гидролиз нуклеотидпептидов смесью концентрированных HCl/F<sub>2</sub>CCOOH приводит к отщеплению  $^{14}$ O-фосфотриозина.

В гене А бактериофага  $\phi$ X 174 в одной рамке считывания кодируются белки А ( $M_r$  59 000) и А\* ( $M_r$  37 000), имеющие общую С-концевую часть. Белок А играет ключевую роль в репликации фаговой ДНК. Он инициирует репликацию, внося точечный разрыв в (+)-цепь репликативной формы ДНК  $\phi$ X 174 в точке начала репликации, и ковалентно прикрепляется при этом к 5'-концу ДНК. После окончания цикла репликации белок отрывает и ковалентно замыкает вытесненную (+)-цепь [1, 2]. Функции белка А\* неизвестны; предполагают, что он подавляет репликацию ДНК хозяина [3–7]. Очищенные белки А и А\* *in vitro* имеют сходные свойства. Оба белка являются сайт-специфическими эндонуклеазами и лигазами. Как А-, так и А\*-белок в ходе эндонуклеазной реакции генерируют свободную 3'-гидроксильную группу и ковалентно присоединяются к 5'-концу ДНК в точке разрыва. Лигирование этого разрыва, по-видимому, сопряжено с гидролизом связи ДНК–белок [8–11].

При обработке очищенным белком А\* синтетического гексадекадезоксирибонуклеотида СААСТТГАТАТТААТА, содержащего область начала репликации (+)-цепи ДНК фага  $\phi$ X 174, происходит гидролиз связи G–A (точка начала репликации) с образованием ковалентного соединения (белок А\*)–АТАТТААТА и гептануклеотида СААСТТGoh, а затем их лигирование с воссозданием исходного гексадекануклеотида [12]. Наряду с гексадекануклеотидом в числе продуктов лигазной реакции идентифицированы олигонуклеотиды СААСТТGAG, СААСТТGAGG и СААСТТGAGGA. Предполагают, что *in vivo* к белку ковалентно присоединяются олигонуклеотиды AG, AGG и AGGA и препарат «очищенного белка» содержит такие ковалентные соединения [12]. В ходе лигазной реакции *in vitro* олигонуклеотиды переносятся с белка на 3'-конец ДНК. В пользу существования в клетках белка А\*, ковалентно связанного с олигонуклеотидами, свидетельствует и наличие радиоактивного фосфата в белке, выделенном из клеток, зараженных в присутствии [ $^{32}$ P]ортофосфата [12].

Настоящая работа посвящена доказательству существования ковалентной связи белка А\* с нуклеотидами и исследованию природы связи ДНК–белок.

Белок А\*, содержащий радиоактивный фосфат, выделяли из клеток *E. coli* С, зараженных фагом  $\phi$ X174 *at*3 в присутствии [ $^{32}$ P]ортофосфата. Фракцию, содержащую белок А\*, обрабатывали РНКазами и разде-

Принятые сокращения: ФДЭ – фосфодиэстераза змеяного яда, SDS – додецилсульфат натрия.

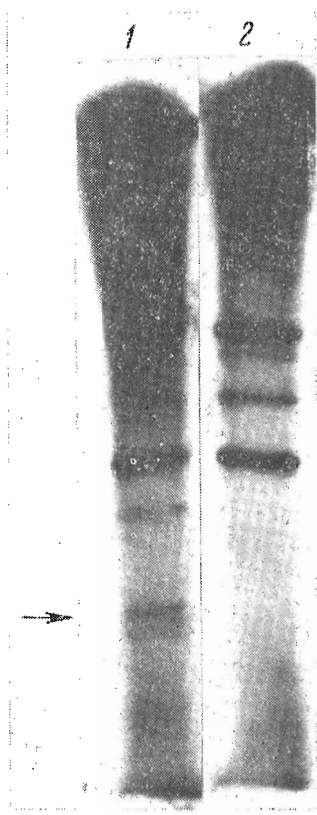


Рис. 1

Рис. 1. Электрофорез в 15% ПААГ, содержащем SDS [13], экстрактов клеток, зараженных в присутствии [ $^{32}$ P]ортофосфата  $\varnothing$ X174am3(A $^{+}$ ) (1) и  $\varnothing$ X174amH90(A $^{*}$ ) (2). Стрелкой показано положение маркера — белка A $^{*}$

Рис. 2. Анализ продуктов гидролиза [ $^{32}$ P]нуклеотидпептидов ФДЭ с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге. Среднее значение фона (16 имп/мин) вычтено в каждой точке. Пробы просчитывали в толуольном сцинтилляторе дважды (4 и 10 мин)

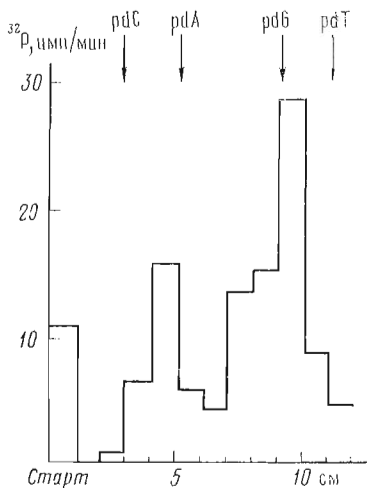


Рис. 2

ляли электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS [13] (рис. 1). Маркером служил очищенный белок A $^{*}$  (см. «Экспериментальную часть»). Одна из радиоактивных зон совпадала по подвижности с белком A $^{*}$  ( $M_r$  37 000) и отсутствовала в экстрактах клеток, зараженных в тех же условиях амбер-мутантом по гену A $^{*}$ -amH90, что позволило однозначно отнести ее к белку A $^{*}$ . Для выяснения природы фосфатсодержащего вещества, связанного с белком A $^{*}$ , радиоактивный материал обрабатывали проназой и гидролизат разделяли высоковольтным электрофорезом на бумаге при pH 3,5.  $^{32}$ P-Содержащие пептиды, мигрирующие при этом значении pH к аноду, обрабатывали фосфодиэстеразой змеиного яда (ФДЭ). Продуктами полного гидролиза фосфатсодержащих пептидов ФДЭ (см. рис. 2) являются pdA и pdG. Для определения природы аминокислотного остатка в белке A $^{*}$ , ковалентно связанного с нуклеотидами, [ $^{32}$ P]нуклеотидпептиды, экстрагированные из геля, очищали хроматографией на DEAE-сефадексе при pH 8,6 и гидролизовали смесью концентрированных HCl и F $_3$ CCOOH. Анализ двумерным электрофорезом в тонком слое целлюлозы выявил наличие в гидролизате лишь двух  $^{32}$ P-меченых продуктов: ортофосфата и  $^4$ O-фосфотирозина (рис. 3).

Фосфатная группа фосфотирозина, образующегося при кислотном гидролизе, участвовала в связи с нуклеотидными остатками, так как не менее 90% фосфатсодержащего вещества, связанного с пептидами, представляют собой нуклеотиды. Следовательно, в состав «узла связи» белка A $^{*}$  с нуклеотидами входит тирозин. Эта связь является фосфодиэфирной, так как она гидролизруется фосфодиэстеразой.

Таким образом, в клетках, зараженных фагом  $\varnothing$ X174, доказано существование ковалентного соединения белка A $^{*}$  с нуклеотидами и установлено, что нуклеотиды соединены фосфодиэфирной связью с тирозиновым остатком белка. Определенный нами состав нуклеотидных фрагмен-

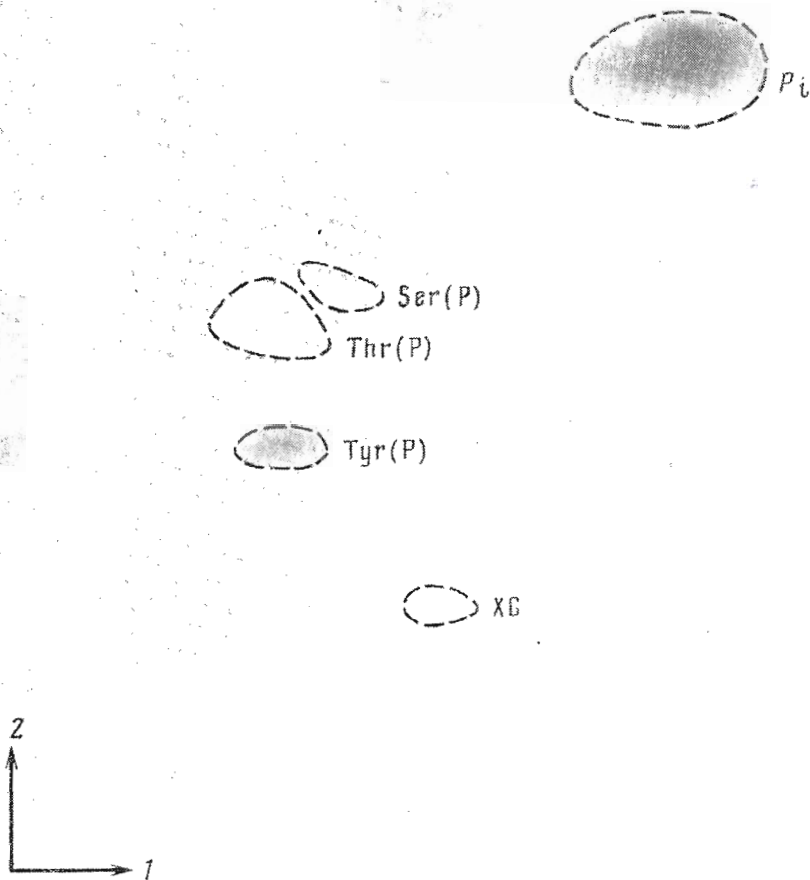


Рис. 3. Радиоавтограф двумерного электрофореза в тонком слое целлюлозы продуктов кислотного гидролиза  $[^{32}\text{P}]$ нуклеотидов в присутствии маркерных O-фосфоаминокислот. Направление 1: 50 мМ HOAc/HOOCN, pH 1,9; направление 2: 50 мМ пиридин/HOAc, pH 3,5. XG — ксиленцианол. Положение маркерных аминокислот определено проявлением пинидрином

тов (A, G) совпадает с составом олигонуклеотидов, содержащихся в продуктах аномального лигирования [12].

Во всех ковалентных соединениях топоизомераз типов I и II с ДНК, для которых известна структура «узла связи» белок-ДНК, связь осуществляется через тирозин (топоI *E. coli*, топоII *E. coli* и *M. luteus*, эукариотическая топоI [14, 15]). Общий для белка  $A^*$  и топоизомераз характер связи с ДНК согласуется с общностью свойств этих ферментов, способных вносить в полинуклеотидную цепь точечный разрыв с образованием фосфодиэфирной связи с ДНК в точке разрыва и способных лигировать его.

Свойства белка  $A^*$  *in vitro* хорошо охарактеризованы, но о его биологической роли известно немного. В недавней работе показано, что ген белка  $A^*$  не может быть клоширован в *E. coli*, т. е. его наличие летально для клетки [4]. Некоторые амбер-мутанты по С-концевой части гена A ( $A-A^{*-}$ ) дефектны по способности ингибировать хозяйскую репликацию в отличие от мутантов по N-концу ( $A-A^{*+}$ ) [6]. Показано, что индуцированная фагом фрагментация хозяйской хромосомы зависит от гена  $A^*$  [6, 7]. Представления о молекулярных механизмах подавления белком  $A^*$  репликации ДНК хозяина основаны на свойствах этого белка, выявленных *in vitro* (способность гидролизовать одноцепочечную ДНК, неспецифическое связывание с ДНК с образованием конденсированных структур), и носят спекулятивный характер [3, 8].

Существование в зараженных клетках белка  $A^*$ , ковалентно соединенного с нуклеотидами, вероятно, связано с функциональной активностью белка  $A^*$  in vivo. Изучение механизма образования этого соединения может оказаться полезным для понимания биологической роли белка  $A^*$ .

### Экспериментальная часть

Фаг  $\varnothing X174 am3$  ( $E^-$ ) дефектен по белку  $E$  — фаговому эндонизину. Штамм *E. coli* ( $FX^s$ ,  $Su^-$ ) и коллекция мутантов  $\varnothing X174$  по гену  $A$  были любезно предоставлены проф. Вайсбеком (Утрехтский государственный университет, Нидерланды). Штамм *E. coli* 4704 ( $FX^s$ ,  $Hcr^-$ ,  $Thy^-$ ,  $Su^-$ ) был получен от проф. Денхардта (Университет Восточного Онтарио, Канада). Для выращивания амбер-мутантов использовали *E. coli* 4712 ( $FX^s$ ,  $Thy^-$ ,  $Res^-$ ,  $Su^+$ ). Препараты фага, приготовленные по стандартным процедурам, имели титр  $10^{11}$ — $10^{12}$  и содержали  $10^{-4}$ — $10^{-5}$  ревертантов. Бедная по фосфату среда М9Р аналогична описанной в работе [16].

Белки  $A$  и  $A^*$  выделяли из  $10^8$  клеток *E. coli*  $S$ , зараженных фагом  $\varnothing X174 am3$ , в основном по процедуре [17]. Отличия состояли в том, что: а) лизис проводили по методике [18]; б) к биомассе добавляли клетки *E. coli* 4704, зараженные фагом  $\varnothing X174 am3$ , в которых фаговые белки были мечены [ $^{14}C$ ]аминокислотами. Для специфического мечения фаговых белков клетки перед заражением облучали УФ-светом [19]; в) очистку заканчивали хроматографией на колонке с ДНК-целлюлозой. Содержание во фракциях белков  $A$  и  $A^*$  определяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS [13] и флуорографии. Препарат, полученный хроматографией на ДНК-целлюлозе, на 90% состоял из смеси белков  $A$  и  $A^*$ . Белок  $A^*$ , содержащий [ $^{32}P$ ]фосфат, выделяли из клеток *E. coli*  $S$ , зараженных  $\varnothing X174 am3$  в присутствии  $H_3^{32}PO_4$ . Клетки выращивали на среде М9Р при  $37^\circ C$  до  $A_{590}=0,6$  и заражали фагом с множественностью 5—10. Через 5 мин после заражения добавляли  $H_3^{32}PO_4$  (Радиопрепарат, СССР) до 50 мкКи/мл, через 30 мин после заражения клетки собирали, замораживали в жидком азоте, лизировали и лизат фракционировали с помощью  $(NH_4)_2SO_4$ , как описано в работе [18]. Фракцию, содержащую меченый белок  $A^*$ , обрабатывали РНКазами  $A$  (Worthington, США) и  $T_1$  (Calbiochem, США) и разделяли электрофорезом в 15% ПААГ по Лэммли [13]. Полоску геля, содержащую радиоактивный белок  $A^*$ , растирали стеклянной палочкой в пробирке и инкубировали 5 ч при  $37^\circ C$  в равном объеме раствора проназы  $E$  (Merck, ФРГ) с концентрацией 100 мкг/мл. Супернатант после центрифугирования лиофилизировали и растворяли в минимальном объеме воды. Электрофорез нуклеотидпептидов и продуктов их гидролиза проводили на бумаге Whatman 1 при 30 В/см в 50 мМ формиате аммония, рН 3,5. Гидролиз элюированных нуклеотидпептидов ФДЭ (Worthington, США) осуществляли в буфере, содержащем 30 мМ трис- $HCl$  (рН 8,2), 10 мМ  $MgCl_2$ , при концентрации фермента 500 мкг/мл (30 мин,  $37^\circ C$ ). Продукты гидролиза ФДЭ делили с помощью высоковольтного электрофореза в тех же условиях, что и нуклеотидпептиды.

Нуклеотидпептиды, полученные при гидролизе проназой, хроматографировали на колонке (50 мкл) с DEAE-сефадексом (Pharmacia, Швеция), уравновешенном 50 мМ  $NH_4HCO_3$  (рН 8,6). Образец наносили на колонку в объеме 200 мкл, 3 раза промывали 200 мкл стартового буфера и элюировали 2 М  $NH_4HCO_3$  (рН 8,6), собирая фракции по 100 мкл. Во фракциях определяли радиоактивность по Черенкову.

Кислотный гидролиз нуклеотидпептидов проводили смесью  $HCl$  и  $F_3CCOOH$  (2:1) при  $166^\circ C$  в течение 30 мин. Электрофорез в тонком слое целлюлозы осуществляли как описано в работе [20], на пластинках Eastman (США). В качестве внутренних маркеров использовали  $O$ -фосфосерин (Calbiochem, США),  $O$ -фосфотреонин (Gee Lawson, Великобритания) и  $O$ -фосфотирозин, синтезированный по методике [21].

1. Kornberg A. DNA Replication. San Francisco: Freeman and Co, 1980.
2. Reinberg D., Zipursky S. L., Weisbeek P., Brown D., Hurwitz J. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 1, p. 529-537.
3. Eisenberg S., Ascarelli R. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 8, p. 1991-2002.
4. van der Avoort H. G. A. M., Teertstra R., Versteeg R., Weisbeek P. J. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 741, № 1, p. 94-102.
5. Tessman E. S., Tessman I. In: The Single - Stranded DNA Phages / Eds Denhardt D. T., Dressler D., Ray D. S. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratories, 1978, p. 14-15.
6. Martin D. F., Godson G. N. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, v. 65, № 1, p. 323-330.
7. Funk F. D., Snower D. J. Virol., 1976, v. 18, № 1, p. 141-148.
8. Langeveld S. A., van Mansfeld A. D. M., van der Ende A., van de Pol J. H., van Arkel G. A., Weisbeek P. J. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 3, p. 545-562.
9. Langeveld S. A., van Mansfeld A. D. M., de Winter J. M., Weisbeek P. J. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 8, p. 2177-2188.
10. van der Ende A., Langeveld S. A., Teertstra R., van Arkel G. A., Weisbeek P. J. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 9, p. 2037-2053.
11. Eisenberg S., Finer M. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5305-5315.
12. Mansfeld A. D. M., van Teeffelen H. A. A. M., Zandberg G., Baas P. D., Jansz H. S., Veeneman G. H., van Boom J. H. FEBS Lett., 1982, v. 150, № 1, p. 103-108.
13. Laemmli U. K. Nature (London), 1970, v. 227, № 5259, p. 680-685.
14. Tse Y.-G., Kirkegaard K., Wang J. C. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 12, p. 5560-5565.
15. Champoux J. J. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 10, p. 4805-4809.
16. Hayes D. H., Gros F. In: Methods in Enzymology / Eds Grossman L., Moldave K. N. Y. - L.: Acad. Press, 1978, v. 12, part B, p. 770-774.
17. Eisenberg S., Kornberg A. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 12, p. 5328-5332.
18. Ikeda Y., Yudelevich A., Shimamoto N., Hurwitz J. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 19, p. 9416-9428.
19. Dubeau L., Hours C., Denhardt D. T. Can. J. Biochem., 1981, v. 59, № 1, p. 106-115.
20. Manai M., Cozzone A. J. Anal. Biochem., 1982, v. 124, № 1, p. 12-18.
21. Rothberg P. J., Harris T. J. R., Nomoto A., Wimmer E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 75, № 10, p. 4868-4872.

Поступила в редакцию  
23.11.1984

#### A STUDY OF THE COVALENT BOND IN THE NATURAL COMPLEX OF THE BACTERIOPHAGE $\phi$ X174 A\* PROTEIN AND NUCLEOTIDES

ZOLOTUKHIN A. S., DRYGIN Yu. F., BOGDANOV A. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The  $^{32}\text{P}$ -labelled A\* protein has been isolated from *E. coli* cells infected by phage  $\phi$ X174 in the presence of [ $^{32}\text{P}$ ]orthophosphate. The snake venom phosphodiesterase treatment of the [ $^{32}\text{P}$ ]peptides obtained by the pronase digestion of the protein has revealed a phosphodiester bond between the protein and a nucleotide material of A, G base composition. The hydrolysis of nucleotide-peptides with a mixture of concentrated HCl and  $\text{CF}_3\text{COOH}$  has yielded  $^4\text{O}$ -phosphotyrosine.