



УДК 577.152.277\*6'14

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕСТ СВЯЗЫВАНИЯ ДНК-ЗАВИСИМОЙ  
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* С ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ  
АНАЛОГАМИ МАТРИЦЫ****Скиба Н. П., Ефимов В. А., Липкин В. М.,  
Чахмахчева О. Г., Обчинников Ю. А.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Проведено фотоиндуцированное ковалентное связывание РНК-полимеразы *E. coli* с декатимидиловыми матрицами, содержащими остаток 5-бром урацила. Локализованы пептиды из  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц минимального фермента, находящиеся в активном центре связывания РНК-полимеразы с ДНК-матрицей.

В продолжение работ по структурно-функциональному исследованию ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* осуществлена локализация структурных элементов этого фермента, входящих в состав активного центра, ответственного за взаимодействие с ДНК-матрицей. Ранее нами было описано ковалентное связывание фермента с фоточувствительными аналогами декатимидиловых кислот и промоторной области G2 ДНК бактериофага fd, содержащих 5-бром урацил, и определена степень участия субъединиц в образовании ковалентных связей с такими матрицами [1, 2]. Однако низкая эффективность УФ-сшивки при нейтральных pH не позволила получить необходимое для проведения структурных работ количество модифицированного фермента.

В ходе дальнейших экспериментов было обнаружено, что по мере понижения pH среды эффективность УФ-сшивки фермента с фоточувствительными аналогами олигонуклеотидов резко повышалась и достигала максимума при pH 3,0 (рис. 1). Возрастала степень модификации  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц минимального фермента и  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\sigma$ -субъединиц полного, тогда как  $\alpha$ -субъединица оставалась немодифицированной, что полностью отражало субъединичную специфичность модификации фермента при pH 7,9 [1]. Эффект возрастания степени модификации, по-видимому, обусловлен увеличением сродства РНК-полимеразы к олигонуклеотидам, которое при переходе pH среды от 7,9 к 3,0 возрастало с 2,5 до 61%, тогда как ферментативная активность на таких матрицах уменьшалась от 1550 до 50 ед./мг. При переходе pH среды от 3,0 к 7,9 фермент полностью восстанавливал свою максимальную активность. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при низких pH так же происходит специфическая модификация фермента в его активном центре связывания с матрицей, как и при pH 7,9, но с большей эффективностью.

В качестве аналога матрицы в данной работе был использован олигонуклеотид d ( $^{32}\text{pT-T-T-T-T-B-T-T-T-T}$ ), поскольку применение протяженных фрагментов ДНК — синтетических аналогов промоторной области — сопряжено с рядом трудноразрешимых задач (разделение модифицированных пептидов и определение их размеров) вследствие значительного влияния протяженного нуклеотидного фрагмента на свойства модифицированного им пептида.

На первом этапе локализации конкретных мест ковалентного связывания РНК-полимеразы с фоточувствительным олигонуклеотидом при

Сокращения: В — бромуридин, Mes — 4-морфолинэтансульфоновая кислота, SDS — додецилсульфат натрия.

Рис. 1. Влияние pH на УФ-сшивку между РНК-полимеразой *E. coli* (минимальный фермент) и  $d(^{32}\text{pT-T-T-T-B-T-T-T-T})$

Рис. 2. Разделение продуктов бромцианового гидролиза модифицированных субъединиц РНК-полимеразы в 20% ПААГ по Лэммли. Указано положение маркерных белков (в скобках молекулярная масса): Г — глюкогон (3500), И — инсулин (5700), Ц — цитохром (12400),  $\alpha$  —  $\alpha$ -субъединица (36500); О — старт, ВРВ — бромфеноловый синий

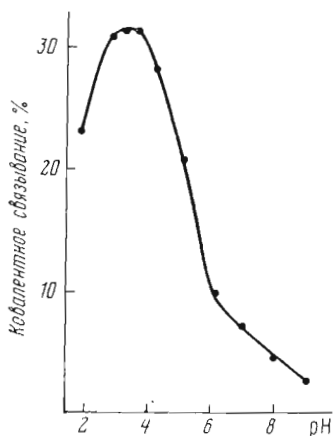


Рис. 1

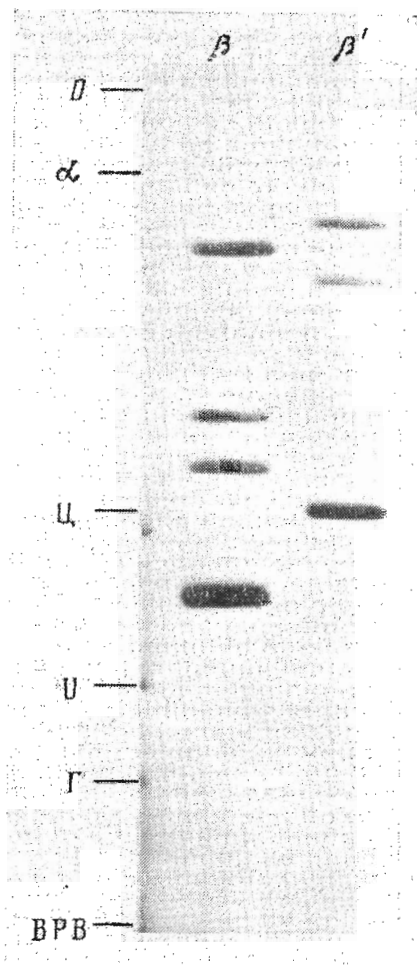


Рис. 2

pH 3,0 изучали распределение радиоактивной метки между бромциановыми пептидами отдельных субъединиц. Анализ образовавшейся смеси пептидов электрофорезом в 20% полиакриламидном геле по Лэммли [3] (рис. 2) показал, что только ограниченное число зон белкового материала содержало радиоактивную метку: у  $\beta'$ -субъединицы 3 пептида из 33 возможных, а у  $\beta$ -субъединицы — 4 из 38. Однако из известной структуры субъединиц РНК-полимеразы [4, 5] следует, что в их составе нет бромциановых пептидов, содержащих более 150 аминокислотных остатков (а.о.), которые могли бы соответствовать верхним полосам радиоактивности (рис. 2). Появление этих полос может быть обусловлено склонностью бромциановых пептидов к агрегации даже в присутствии детергента, а также неполнотой расщепления бромцианом, связанной с большей компактностью субъединиц фермента, модифицированных олигонуклеотидом, по сравнению с нативными субъединицами. Таким образом, реальное количество модифицированных пептидов в данном случае сводится, по-видимому, к одному-двум для каждой субъединицы.

Учитывая положение меченых пептидов на геле относительно белков-маркеров, а также вклад 10-звенного модифицирующего олигонуклеотида в подвижность пептидов, можно сделать вывод, что длина нижнего меченого пептида  $\beta$ -субъединицы равна  $\sim 40-50$  а. о., а верхних —  $\sim 120-130$  а. о. и более. Для  $\beta'$ -субъединицы длина нижнего модифицированного пептида (рис. 2) была равна  $\sim 90-100$  а. о.

В серии препаративных экспериментов ковалентное связывание РНК-полимеразы с олигонуклеотидом  $d(^{32}\text{pT-T-T-T-T-B-T-T-T-T})$  осуществля-

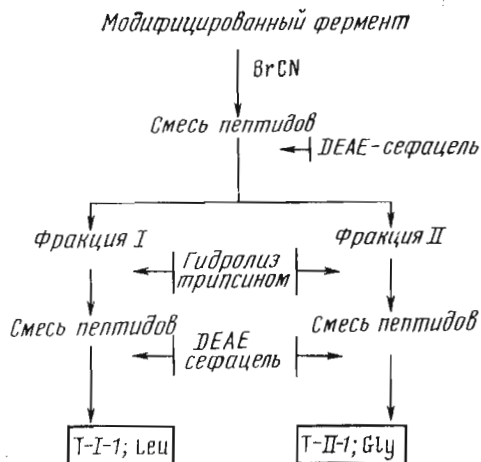


Рис. 3. Схема очистки модифицированных пептидов. Указан индивидуальный пептид и его N-концевой аминокислотный остаток

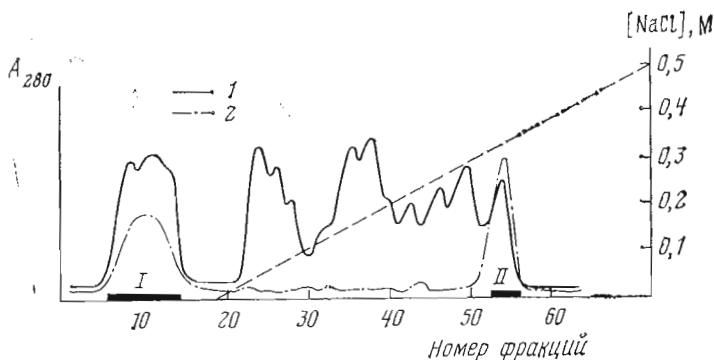


Рис. 4. Разделение бромциановых пептидов хроматографией на DEAE-сефацэле (колонка  $2 \times 35$  см) в 7 М мочеvine, 0,05 М ацетате натрия, pH 5,0, и градиенте концентрации NaCl. 1 — поглощение, 2 — радиоактивность

ли в условиях, описанных ранее для аналитических опытов [1]. Для обеспечения максимальной эффективности ковалентного связывания УФ-сшивку проводили с минимальным ферментом при pH среды 3,0. Схема выделения модифицированных пептидов была упрощена, в ней отсутствовала стадия деления субъединиц фермента, что повышало результирующий выход модифицированных пептидов и делало возможным определение их N-концевых аминокислот (рис. 3). После проведения фотоиндуцированного связывания с олигонуклеотидом фермент осаждали сульфатом аммония (60% от насыщения), отделяя таким образом избыток олигонуклеотида, не вступившего в реакцию. Далее проводили диализ против 0,1 М бикарбоната аммония и лиофилизацию. Фрагментацию белкового материала осуществляли бромцианом и образовавшуюся смесь пептидов фракционировали на DEAE-сефацэле. В результате были получены фракции радиоактивного материала, содержавшие модифицированные пептиды (рис. 4).

Фракция I (рис. 4) состояла из смеси пептидов, не обладавших средством к сорбенту. Отсутствие средства для модифицированного пептида может быть объяснено его сильной основностью, способной нейтрализовать по заряду 10-звенный модифицирующий олигонуклеотид. Фракция II, элюировавшаяся  $\sim 0,3$  М NaCl, была представлена одним пептидом с глутаминовой кислотой в качестве N-концевого остатка (пептид B-II).

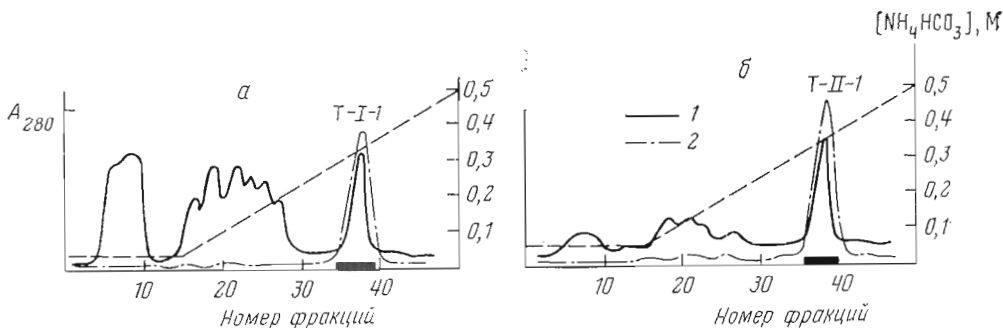


Рис. 5. Разделение триптических пептидов из фракций I (а) и II (б) рис. 4 на колонке с DEAE-сефацелом (1 × 10 см) в градиенте концентрации  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 8,0). 1 — поглощение, 2 — радиоактивность

Чтобы выделить гомогенный модифицированный пептид из фракции I а также определить пептид В-2, пептидный материал из этих фракций гидролизовали трипсином. Последующее фракционирование полученных смесей пептидов проводили хроматографией на DEAE-сефацеле (рис. 5).

На уровне сравнительно небольших по длине триптических пептидов модифицирующий олигонуклеотид существенно влиял на свойства ковалентно связанного с ним пептида, обусловив полное отделение от немодифицированных пептидов при ионообменной хроматографии. N-Концевой анализ полученных в результате фракций T-I-1 и T-II-1 показал, что они представлены гомогенными пептидами с лейцином и глицином в качестве N-концевых аминокислот соответственно.

Анализ первичной структуры  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц РНК-полимеразы [4, 5] показал, что в составе  $\beta'$ -субъединицы не может быть бромциановых пептидов с N-концевой аминокислотой Glu. Таким образом, модифицированный пептид В-II принадлежал  $\beta$ -субъединице, которая имеет в своем составе четыре бромциановых пептида с Glu в качестве N-концевой аминокислоты. Из них только два пептида содержат в своем составе триптические пептиды с N-концевой аминокислотой Glu с размерами 76 и 37 а. о. Размеры последнего (пептид длиной 37 а. о.) хорошо согласуются с размером нижнего модифицированного пептида для  $\beta$ -субъединицы (рис. 2). На основании первичной структуры  $\beta$ -субъединицы можно сделать вывод, что пептид В-II, участвующий в фотоиндуцированном связывании с аналогом матрицы, имеет следующую структуру:

<sup>705</sup>GluArgAlaValAlaValAspSerGlyValThrAlaValAlaLysArgGlyGlyValValGln

<sup>710</sup>TyrValAspAlaSerArgIleValIleLysValAspGluAspGluMet,

а пептид, образующийся при обработке фрагмента В-II трипсином (фракция T-II-1, рис. 5) с N-концевой аминокислотой Gly, имеет структуру

<sup>721</sup>GlyGlyValValGlnTyrValAspAlaSerArg (пептид T-II-1).

С другой стороны, руководствуясь данными Смита [6], касающимися фотоиндуцированного ковалентного связывания урацила с аминокислотами, согласно которым наиболее активно реагируют с ним цистеин, фенилаланин, тирозин и гистидин, можно предположить, что наиболее вероятной точкой связывания пептида T-II-1  $\beta$ -субъединицы с олигонуклеотидом является Tyr<sup>726</sup>.

При идентификации бромцианового пептида из фракции I (рис. 4) учитывались следующие его характеристики: а) высокий положительный заряд, способный нейтрализовать 10-звенный модифицирующий олигонуклеотид в условиях проведения хроматографии на DEAE-сефацеле при рН 5,0; б) размер по данным электрофореза в ПААГ. К сильноосновным BrCN-пептидам из  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц следует отнести три, имеющих в своем составе триптические пептиды с N-концевой аминокислотой Leu: два из  $\beta'$ -субъединицы размером 42 и 93 а.о. и один из  $\beta$ -субъединицы размером 109 а.о. [4, 5]. Из них только пептид размером 93 а.о. соответствовал

длине одного из модифицированных пептидов  $\beta'$ -субъединицы, определенной в аналитических опытах. Следовательно, можно сделать вывод, что фракция I (рис. 4) была представлена модифицированным бромциановым пептидом из  $\beta'$ -субъединицы РНК-полимеразы, имеющим следующую структуру:

Arg Thr Phe His Ile Gly Gly Ala Ala Ser Arg Ala Ala Ala Glu Ser Ser Leu Gln Val Lys  
 Asn Lys Gly Ser Ile Lys Leu Ser Asn Val Lys Ser Val Val Asn Ser Ser Gly Lys Leu Val  
 Ile Thr Ser Arg Asn Thr Glu Leu Lys Leu Ile Asp Glu Phe Gly Arg Thr Lys Glu Ser Tyr  
 Lys Val Pro Tyr Gly Ala Val Leu Ala Lys Gly Asp Gly Gln Glu Val Ala Gly Gly Glu Thr  
 Val Ala Asn Trp Asn Pro His Thr Met [5].

При расщеплении трипсином он может образовывать три пептида с N-концевым Leu, один из которых будет соответствовать пептиду T-1-1 (рис. 5а):

Leu Ser Asn Val Lys, Leu Val Ile Thr Ser Arg, Leu Ile Asp Glu Phe Gly Arg.

Наиболее вероятно, что в ковалентном связывании принимает участие пептид 984—990, так как лишь он содержит в своем составе одну из аминокислот (фенилаланин), взаимодействующих с урацилом при облучении УФ-светом. Тогда Phe<sup>988</sup> может являться местом ковалентного присоединения фоточувствительного олигонуклеотида к  $\beta'$ -субъединице минимального фермента при облучении такого комплекса.

### Экспериментальная часть

В работе использованы трис, акриламид и N,N-метиленисакриламид (Merck, ФРГ), бромциан, EDTA, дитиотреит (Serva, ФРГ), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР и [<sup>14</sup>C]АТР (Amersham, Англия), DEAE-бумага (Whatman, Англия), трипсин и Т4-полинуклеотидкиназа (Worthington, США), DEAE-сефацель (Pharmacia, Швеция). Радиоактивность определяли с помощью сцинтилляционного счетчика Beckman S7000 (США). Химический синтез олигонуклеотида d(T-T-T-T-T-B-T-T-T) осуществляли блочным фосфодиэфирным методом [7]. 5'-<sup>32</sup>P-Меченные препараты олигонуклеотида (уд. акт. 25—50 мкКи/моль) получали с помощью [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР и Т4-полинуклеотидкиназы по методу Ричардсона [8].

Облучение препаратов УФ-светом проводили при 20° С тремя лампами БУФ-15 (ртутная лампа низкого давления, мощность 15 Вт) с расстояния 7 см на полосках парафильма American Can Comp. USA) в объеме 50—200 мкл. Интенсивность светового потока в этих условиях при 254 нм была определена с помощью уридиновой актинометрии по методу Ванга [9] и соответствовала 40·10<sup>3</sup> эрг/мм<sup>2</sup>·мин.

ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* (КФ 2.7.7.6; полный и минимальный фермент) была выделена из клеток *E. coli* MR4-600 по методу Бургеса [10], причем стадия очистки фермента на колонке с ДНК-целлюлозой была заменена хроматографией на ДНК-агарозе [11]. Активность фермента (500 и 450 ед./мг соответственно для полного и минимального фермента) определяли с использованием в качестве матрицы ДНК тимуса теленка (Worthington, США), а его чистоту — электрофорезом в полиакриламидном геле.

*Фотоиндуцированное связывание РНК-полимеразы E. coli с олигонуклеотидом d(<sup>32</sup>P-T-T-T-T-T-B-T-T-T) при различных рН среды.* Для создания рН инкубационной среды в интервале 2,0—9,0 использовали буферные растворы: глицин-HCl (рН 2,0—4,0), MES (рН 5,0 и 6,0) и трис-HCl (рН 7,0—9,0). 50 мкл раствора, содержащего 0,04 М соответствующий буфер, 0,01 MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мМ дитиотреит, 5% глицерин, 10 мкг (20 пмоль) РНК-полимеразы (минимальный фермент) и 40 пмоль [5'-<sup>32</sup>P]декануклеотида, инкубировали 10 мин при 30° С, затем инкубационную смесь облучали УФ-светом в стандартных условиях в течение 15—20 мин. Далее добавляли 25 мкл буфера следующего состава: 125 мМ трис-HCl (рН 6,8), 20% глицерин, 3% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол, 0,002% бромфеноловый голубой. Смесь прогревали 1—2 мин при 100° С и наносили на 7% полиакриламидный гель (пластина 20 × 20 × 0,15 см), содержащий 0,375 М трис-HCl (рН 8,8), 0,1% SDS, с использованием 3%-ного концентрирующего геля, содержащего 0,125 М трис-HCl (рН 6,8) и 0,1% SDS. Электрофорез проводили при 30 мА. В качестве электродного буфера был взят раствор, содержащий 0,025 М трис и 0,192 М глицин (рН 8,8). После проведения электрофореза гель радиоавтографировали, вырезали полосы радиоактивности, определяли ее значение на сцинтилляционном счетчике и подсчитывали эффективность УФ-сшивки по отношению радиоактивности полосы, соот-

ветствовавшей  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединицам, к радиоактивности меченого декануклеотида, внесенного в реакционную среду.

*Комплексообразование РНК-полимеразы с синтетическим декануклеотидом при pH 7,9 и 3,0.* 100 мкл связывающего буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl (pH 7,9) или 20 мМ глицин-HCl (pH 3,0), 0,12 М KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ дитиотреит, 5% глицерин, 1 пмоль меченого олигонуклеотида (10<sup>6</sup> имп/мин) и 10 пмоль фермента, инкубировали 10 мин при 37° С. Раствор разбавляли 900 мкл того же буфера, содержащего 15 мкг одноцепочечной ДНК фага fd, выдерживали еще 10 мин и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (тип HA, диаметр пор 0,45 мкм, Millipore Corp., США). Фильтры промывали 2 мл того же буфера, спиртом, высушивали и просчитывали на сцинтилляционном счетчике.

*Определение активности РНК-полимеразы на олигонуклеотидной матрице при pH 3,0 и 7,9.* 50 мкл реакционной смеси, состоящей из 0,04 М буфера (трис-HCl, pH 7,9, или глицин-HCl, pH 3,0), 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,3 мМ [<sup>14</sup>C]ATP (3,3 МКи/ммоль), 1 мМ дитиотреита, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 600 пмоль декануклеотида и 2 пмоль РНК-полимеразы, инкубировали 30 мин при 20° С. Затем пробы наносили на квадраты (1,5 × 1,5 см) из DEAE-бумаги, промывали их 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (из расчета 5 мл раствора на квадрат), водой, спиртом, высушивали и просчитывали в толуольном сцинтилляторе.

*Облучение комплекса РНК-полимеразы E. coli (100 нмоль) с олигонуклеотидом (500 нмоль) проводили в буфере, содержащем 0,04 М глицин-HCl (pH 3,0), 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 5% глицерин, 1 мМ дитиотреит. Смесь инкубировали 10 мин порциями по 10 мл при 37° С, затем наносили в виде 50 капель по 200 мкл каждая на полоску парафильма и облучали в стандартных условиях. Подобную операцию повторяли 10 раз.*

*Расщепление модифицированного фермента бромцианом.* Модифицированный фермент после облучения осаждали сульфатом аммония (60% от насыщения), осадок растворяли в 0,1 М бикарбонате аммония (pH 8,0), диализовали против того же буфера, а затем лиофилизовали. Сухой остаток растворяли в 10 мл 70% муравьиной кислоты, добавляли бромциан (из расчета 500-кратный избыток на остаток метионина) и выдерживали 20 ч при 20° С. Смесь лиофилизовали до полного удаления муравьиной кислоты и сухой остаток растворяли в 20 мл буфера, содержащего 7 М мочевины и 0,05 М ацетат натрия (pH 5,0).

*Хроматография смеси бромциановых пептидов на колонке с DEAE-сефацелем.* Колонку (2 × 35 см) промывали 19 объемами 0,05 М ацетата натрия (pH 5,0) в 7 М мочевины. Затем наносили смесь бромциановых пептидов, растворенную в этом же буфере. Пептидный материал элюировали градиентом концентрации хлористого натрия от 0 до 0,5 М (объем градиента 1 л) (рис. 4).

*Гидролиз трипсином.* Фракции I и II (рис. 4), содержащие радиоактивный материал, диализовали против 0,05 М бикарбоната аммония, лиофилизовали и далее растворяли в 3 мл 0,05 М бикарбоната аммония, pH 8,0. Гидролиз трипсином проводили с соотношением фермент — субстрат 1 : 30 в течение 24 ч при 20° С.

*Хроматография смеси триптических пептидов.* Триптический гидролизат наносили на колонку (1 × 10 см) с DEAE-сефацелем, предварительно уравновешенным 0,05 М бикарбонатом аммония, pH 8,0. Элюцию пептидов проводили градиентом концентрации бикарбоната аммония от 0,05 до 0,5 М (объем градиента 100 мл) (рис. 5).

Для определения N-концевой последовательности пептидов использовали метод Эдмана с идентификацией аминокислот в виде 1-диметиламинонафталин-5-сульфонильных (Dns) производных и фенилтиогидантоинов (Pth) аминокислот как описано в работе [12].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чазмахчева О. Г., Скиба Н. П., Липкин В. М., Модянов Н. Н. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1410—1421.
2. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чазмахчева О. Г., Скиба Н. П., Липкин В. М. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 4, с. 485—493.

3. Laemmli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680—685.
4. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Чертов О. Ю., Модянов Н. Н., Гринкевич В. А., Макарова И. А., Марченко Т. В., Половникова И. П., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. Докл. АН СССР, 1980, т. 253, № 4, с. 994—998.
5. Овчинников Ю. А., Монастырская Г. С., Губанов В. В., Гурьев С. О., Саломатина И. С., Шуваева Т. М., Липкин В. М., Свердлов Е. Д. Докл. АН СССР, 1981, т. 261, № 3, с. 763—768.
6. Smith K. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, v. 34, № 3, p. 354—357.
7. Sande J. H., Caruthers M. N., Kumar A., Khorana H. G. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 3, p. 571—586.
8. Richardson C. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1965, v. 54, № 1, p. 158—165.
9. Wang S. Y. Photochem. and Photobiol., 1962, v. 1, № 2, p. 135—145.
10. Burgess R. R., Jendrisak J. J. Biochemistry, 1975, v. 14, № 21, p. 4634—4638.
11. Schaller H., Nusslein C., Bonhoeffer F. J., Kurz C., Nietzsche I. Eur. J. Biochem., 1972, v. 26, № 4, p. 474—481.
12. Липкин В. М., Марченко Т. В., Хохряков В. С., Половникова И. Н., Потапенко Н. А., Модянов Н. Н., Овчинников Ю. А. Биорган. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 332—347.

Поступила в редакцию  
17.I.1986

#### LOCALIZATION OF BINDING SITES ON *E. COLI* DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FOR PHOTSENSITIVE TEMPLATE ANALOGUES

SKIBA N. P., EFIMOV V. A., LIPKIN V. M., CHAKHMAKHCHIEVA O. G.,  
OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The photoinduced covalent binding of *E. coli* RNA polymerase with decathymidylic templates containing 5-bromouracyl residue has been carried out. Peptides from  $\beta$  and  $\beta'$  subunits of the core-enzyme, situated in the DNA-template binding site of the RNA polymerase active center have been localized.