



УДК 577.153.35.02

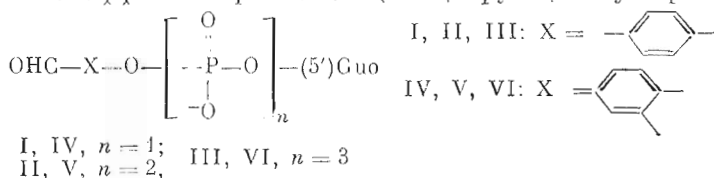
ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОСТАТКОВ ЛИЗИНА В ОБЛАСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ИНИЦИИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* *

*Грачев М. А., Лухтанов Е. А., Мустаев А. А.,
Рихтер В. А.*, Рабинов И. В.*, Скоблов Ю. С.*,
Абдукаюмов М. Н.**

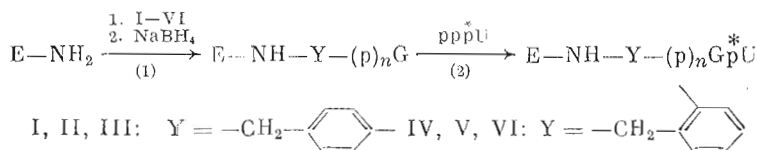
*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР;*

**Институт ядерной физики Академии наук УзССР, Ташкент*

Для зондирования остатков лизина в области связывания 5'-конца иницирующего субстрата РНК-полимеразы *E. coli* из метилимидазолидов соответствующих нуклеотидов [2] и формилфенолов нами были синтезированы шесть аффинных реагентов (иницирующих субстратов):



Один из указанных реагентов (10^{-3} М) добавляли к комплексу РНК-полимеразы ($4 \cdot 10^{-7}$ М) с фрагментом ДНК фага Т7, содержащим промоторы А₀, А₁, А₂, А₃ [3] (10^{-7} М), в буферном растворе состава: 40 мМ триэтанолламин (рН 8,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ рифампицин; после инкубации в течение 30 мин при 37° С в смесь вводили NaBH₄ (10 мМ), а затем [α -³²P]УТР или [α -³³P]УТР ** (2000 Ки/ммоль, 10^{-6} М). При этом происходило сверхселективное аффинное мечение [6, 7] РНК-полимеразы благодаря тому, что на первом этапе остаток реагента ковалентно связывался с белком путем образования оснований Шпиффа с остатками лизина и последующего восстановления их боргидридом натрия, а на втором этапе элонгировались радиоактивным остатком рН только те остатки реагента, которые оказывались надлежащим образом ориентированы относительно активного центра синтеза фосфодиэфирной связи и были способны вступать в ферментативную реакцию:



После аффинного мечения фермент диссоциировали на субъединицы (β' , β , σ , α) и анализировали гель-электрофорезом по методике [8]. Оказалось, что во всех случаях метится только β -субъединица, причем включение метки падает в ряду реагентов (IV) > (VI) > (V) > (III) > (II) > (I). Высокая эффективность аффинного мечения при использовании сочетания (IV) + [α -³³P]УТР свидетельствует о том, что на расстоянии не более

* Предварительные результаты настоящей работы были доложены на советско-французском симпозиуме по молекулярной биологии [1].

** [α -³²P]УТР был синтезирован аналогично тому, как это описано в работе [4], исходя из H₃³³PO₄ [5].

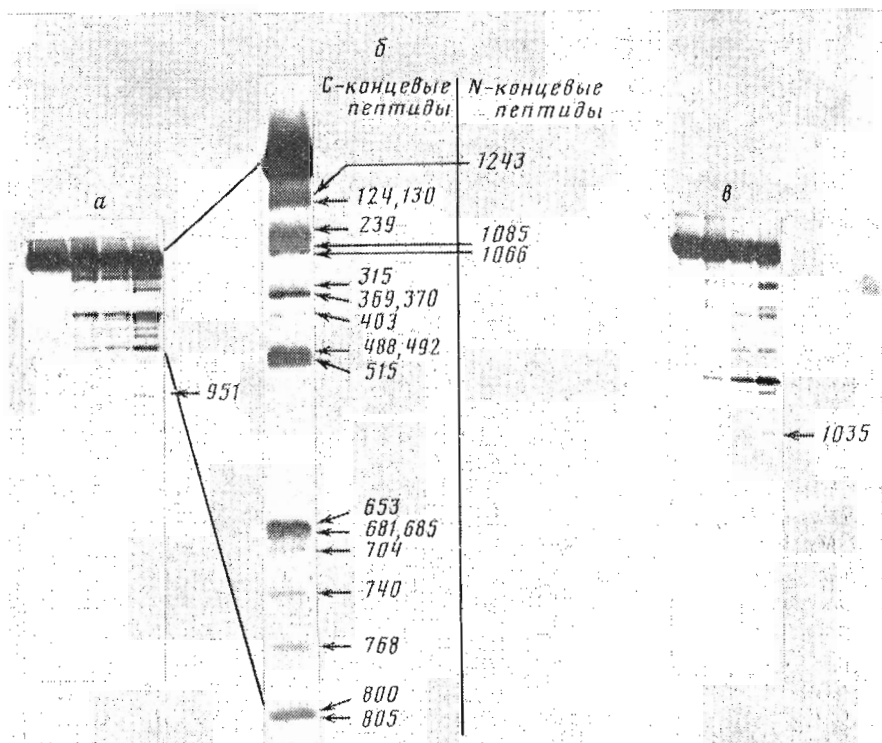


Рис. 1. Локализация участка модификации β -субъединицы РНК-полимеразы, аффинно меченной комбинацией (IV)+УТР (радиоавтографы гелей). Электрофорез проводили по Лэмбли [8]. *a* — продукты частичного бромцианового расщепления β -субъединицы, меченной комбинацией (IV)+ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$. Расщепление проводили так, как описано в [10]. Реакции останавливали через 0, 1, 2, 5 мин. Стрелкой указан кратчайший радиоактивный С-концевой пептид. Использованы 4% концентрирующий и 10–20% градиентный разделяющий гели. *b* — то же, но мечение комбинацией (IV)+ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$; 4% концентрирующий и 6% разделяющий гели. Указаны две серии (N- и С-концевые) радиоактивных пептидов и номера остатков метионинов, расщепление по которым дает эти пептиды. *c* — продукты частичного трипсинолиза β -субъединицы, меченной комбинацией (IV)+ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$. К раствору меченой РНК-полимеразы не добавляли либо добавляли трипсин в весовых соотношениях 1:10⁵, 1:10⁴, 1:10³ (трипсин — РНК-полимераза) (слева направо), выдерживали 30 мин при 20° С и смешивали с 1/4 объема смеси, содержащей 5% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол, 0,5% бромфеноловый синий, 50% глицерин. Перед нанесением нагель смеси выдерживали 10 мин при 56° С. Условия электрофореза как в «*a*»; стрелкой указан кратчайший радиоактивный трипсиновый пептид

0,3 нм от α -атома фосфора инициирующего субстрата в активном центре РНК-полимеразы находится аминогруппа одного из остатков лизина β -субъединицы.

Представлялось интересным локализовать точку аффинного мечения на известной [9] первичной структуре β -субъединицы. Для этого мы воспользовались описанным ранее методом [10], подобным методу Максама — Гилберта, широко применяемому в химии нуклеиновых кислот, и основанным на оценке длин радиоактивных пептидов — продуктов частичного расщепления по остаткам метионина. Расщепление проводили так, чтобы на молекулу аффинно меченной β -субъединицы приходилось в среднем менее одного разрыва пептидной связи. Условия обработки бромцианом, а также интерпретация получаемых данных подробно описаны в работе [10] для другого аффинного реагента. Из картины распределения радиоактивных пептидов (рис. 1*a*) следовало, что кратчайший С-концевой радиоактивный пептид образуется при расщеплении по остатку Met⁹⁵¹. Следующий остаток метионина в β -субъединице — это Met¹⁰⁶⁶ [9]. Чтобы однозначно доказать, что точка аффинного мечения действительно находится на участке Met⁹⁵¹ — Met¹⁰⁶⁶, мы определили также длину кратчайшего N-концевого радиоактивного пептида (рис. 1*b*), проведя разде-

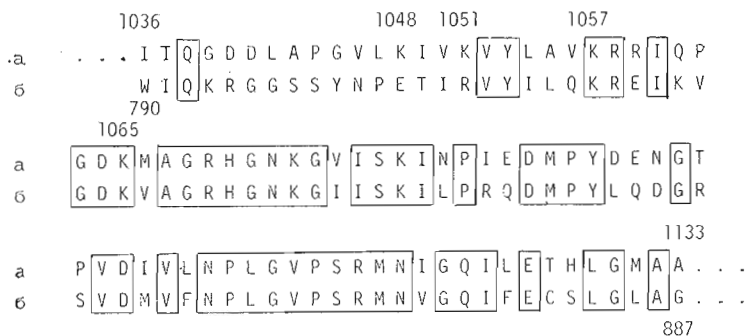


Рис. 2. Область высокой гомологии β -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* (а) и соответствующей субъединицы РНК-полимеразы из хлоропластов табака [11] (б). Указаны номера остатков лизина этой области. В рамки взяты участки полной гомологии

ление высокомолекулярных пептидов в низкопроцентном геле. Оказалось, что этим пептидом действительно является продукт расщепления по остатку Met¹⁰⁶⁶ *.

Для более точной локализации мы исследовали продукты частичного трипсинолиза (рис. 1в). Кратчайшим трипсиновым С-концевым пептидом оказался продукт расщепления по Lys¹⁰³⁵. Для повышения разрешения мы получили и использовали нуклеотиды, меченные изотопом фосфора ³³P, который при радиоавтографии дает тонкие полосы (рис. 1а, в).

Итак, точкой аффинного мечения при использовании комбинации (IV) + [α -³³P]УТР является один из остатков лизина на участке Le¹⁰³⁶ — Met¹⁰⁶⁶. Интересно, что часть этого участка входит в одну из областей высокой гомологии β -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* и соответствующей субъединицы РНК-полимеразы из хлоропластов табака [11] (рис. 2). При общем уровне гомологии первичных структур субъединиц, составляющей 39%, аминокислотные последовательности этих областей совпадают на 68%. Этот факт позволяет предположить, что данная область является функционально важной для РНК-полимераз. Вероятно, один из остатков лизина — 1051, 1057 и/или 1065 — участвует в электростатическом контакте с α -фосфатом иницирующего субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грачев М. А., Годовикова Т. С., Кутявин И. В., Луханов Е. А., Мустаев А. А., Царев И. Г., Зайчиков Е. Ф., Харгман Г., Шеффнер А. // Молекулярная биология белков и нуклеиновых кислот, 8-й двусторонний симпозиум СССР — Франция / Тезисы докл. Научный центр биологических исследований АН СССР в Пущино, 1986. С. 73.
2. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
3. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 239. № 2. С. 475—478.
4. Walsell T. F., Johnson R. A. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 526. № 1. P. 11—31.
5. Левиц В. И. // Получение радиоактивных изотопов. М., Атомиздат. 1972. С. 129—130.
6. Смирнов Ю. В., Липкин В. М., Овчинников Ю. А., Грачев М. А., Мустаев А. А. // Биоорганич. химия. 1981. Т. 7. № 7. С. 1113—1116.
7. Grachev M. A., Mustaev A. A. // FEBS Lett. 1982. V. 137. № 1. P. 89—94.
8. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
9. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaja G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Chertov O. Yu., Modjanov N. N., Grinkevich V. A., Makarova I. A., Marchenko T. V., Polovnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 116. № 3. P. 621—629.

* Подобный эксперимент не был проведен в работе [10], что из-за «компрессии» полос аффинно меченных пептидов — продуктов частичного расщепления по Met¹¹⁰⁷, Met¹¹¹⁹, Met¹¹³¹ — привело к ошибке в локализации остатка гистидина, метящегося комбинацией β -имидазолида GDP и [α -³²P]УТР. Проверка показала, что это не His¹¹¹⁶, как указано в работе [10], а His¹²³⁷.

10. Грачев М. А., Мустаев А. А., Колочева Т. И. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. с. 723-727.
11. Ohme M., Tanaka M., Chunwongse J., Shinozaki K., Sugiura M. // FEBS Lett. 1986. V. 200. № 1. P. 87-90.

Поступило в редакцию
21.VIII.1986

LOCALIZATION OF LYSINE RESIDUES NEARBY THE SITE OF INITIATING
SUBSTRATE BINDING OF *E. COLI* RNA POLYMERASE

GRACHEV M. A., LUKHTANOV E. A., MUSTAEV A. A.,
RICHTER V. A.*, RABINOV I. V.*, SKOBLOV Yu. S.*, ABDUKAYUMOV M. N.*

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of USSR;*

**Institute of Nuclear Physics of Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent*

Superselective affinity labelling of *E. coli* RNA polymerase in a complex with the promoter-containing fragment of T7 DNA by treatment with ortho-formylphenyl ester of GMP followed by addition of [α - ^{33}P]UTP resulted in covalent binding of the residue — pGpU (p* — radioactive phosphate) with one of lysine residues of the β -subunit, Lys¹⁰⁴⁸, Lys¹⁰⁵¹, Lys¹⁰⁵⁷, Lys¹⁰⁶⁵. The amino acid sequence of this region of the β -subunit of *E. coli* RNA polymerase has a high extent of homology with that deduced for a region of tobacco chloroplast RNA polymerase on the basis of the nucleotide sequence of the chloroplast rpoB-like gene.