



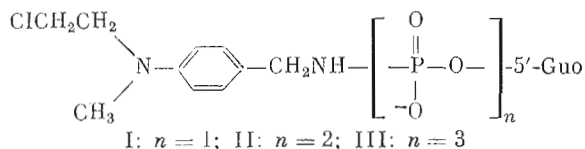
УДК 577.152.277:577.143.7

## ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОЕ АФФИННОЕ МЕЧЕНИЕ ПРОМОТОРА В КОМПЛЕКСЕ С РНК-ПОЛИМЕРАЗой *E. COLI* АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ИНИЦИИРУЮЩИХ СУБСТРАТОВ

Грачев М. А., Лухтанов Е. А., Мустаев А. А.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Для исследования топографии комплекса [промотор · РНК-полимераза] методом аффинной модификации нами по методикам работ [1, 2] были синтезированы три алкилирующих реагента следующей структуры:



Один из указанных реагентов ( $10^{-3}$  М) добавляли к комплексу РНК-полимеразы ( $10^{-7}$  М) с промотором  $A_2$  ( $10^{-7}$  М) [3] в буферном растворе состава 40 мМ трис-НСl, рН 8,5, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 50 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA и после инкубации в течение 2 ч при  $37^\circ\text{C}$  в смесь вводили [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]СТР (2000 Ки/ммоль,  $10^{-6}$  М). При этом происходило сверхселективное аффинное мечение [4, 5]. Результаты экспериментов показаны на рис. 2. Видно, что мечению подвергаются  $\beta$ - и  $\sigma$ -субъединицы фермента, а также матричная ДНК, причем наиболее сильная модификация ДНК наблюдается в случае реагента (II), а реагент (III) в одинаковой степени модифицирует ДНК и субъединицы фермента. Мечение высокоспецифично в силу того, что элонгация ковалентно привязанных на первом этапе остатков реагентов радиоактивными остатками рС происходит под действием активного центра синтеза фосфодиэфирной связи. Радиоактивные продукты, которые можно видеть на рис. 2, не образуются в отсутствие какого-либо из трех компонентов — реагента, фермента, промотора.

Для установления структуры связанного с ДНК радиоактивного остатка (для случая (I) + [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]СТР) полосу ДНК вырезали из геля, отмывали водой, добавляли 0,05 М  $\text{NaN}_2\text{PO}_4$  (рН 2) и выдерживали 1 ч при  $56^\circ\text{C}$ . При этом происходило практически полное отщепление радиоактивного фрагмента от полимера благодаря гидролизу фосфамидной связи. Дальнейший анализ проводили методом микроколоночной жидкостной хроматографии как описано в работе [5]. Как видно из рис. 1, заряд радиоактивного продукта равен  $-3$ , что согласуется с предполагаемой структурой  $\text{pGrC}^*$  ( $\text{p}$  — радиоактивный атом фосфора).

Нами была исследована кинетика отщепления радиоактивного фрагмента в нейтральной среде (рН 8,  $100^\circ\text{C}$ ) от ДНК, аффинно меченой комбинацией (I) + [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]СТР. Скорость этого процесса, протекающего как реакция псевдопервого порядка ( $k_{\text{наж}} = 0,08 \text{ мин}^{-1}$ ), близка к рассчитанной по данным работы [7] скорости элиминации остатков гуанина от ДНК, алкилированной по ним аналогичным реагентом. Поскольку фосфамидная

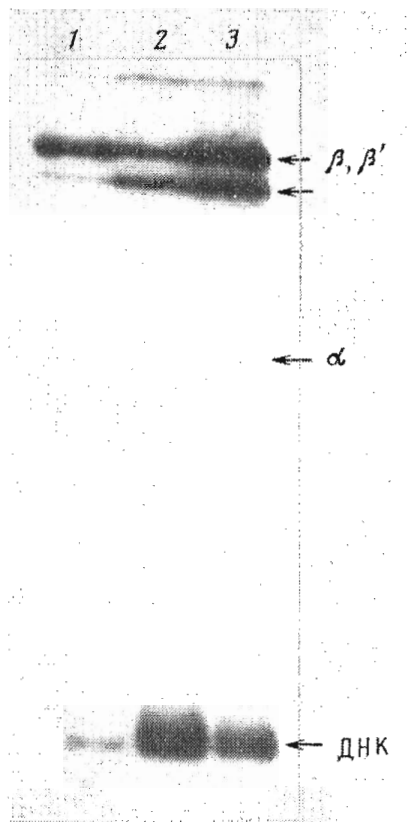


Рис. 1. Радиоавтограф геля-электрофореграммы реакционных смесей после аффинного мечения комплекса промотор-РНК-полимераза реагентами I (1), II (2), III (3) в сочетании с  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$ . Электрофорез проводили по [6] в 12% полиакриламидном геле при 200 В

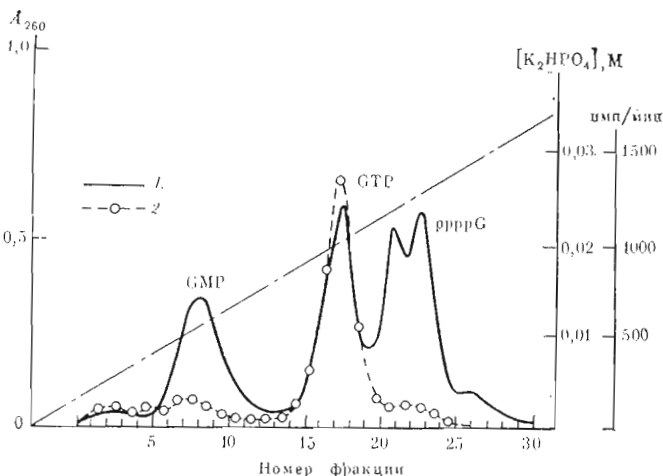
и фосфодиэфирная связи в этих условиях, как было выяснено, устойчивы, убыль радиоактивности в ДНК, очевидно, связана именно с элиминацией модифицированного гуанина.

Эти результаты и данные исследования молекулярных моделей позволяют предположить, что аффинному мечению в описанных условиях подвергается остаток гуанина в положении  $-1$  кодгенной цепи промотора:



Исходя из структуры реагента было оценено максимальное расстояние от  $\alpha$ -атома фосфора иницирующего субстрата до алкилируемого основания промотора. Оно оказалось равным 0,6 нм. Поскольку связанный с ДНК остаток реагента (I) способен выступать в роли «субстрата», т. е. элонгироваться радиоактивным остатком  $\text{rC}$  под действием активного центра, а указанное расстояние меньше диаметра двойной спирали, можно сделать вывод о прямом, не опосредованном белком контакте иницирующего субстрата с матрицей в тройном комплексе [РНК-полимераза · промотор · иницирующий субстрат]. Однако локализацию аффинно меченого остатка основания промотора необходимо в дальнейшем установить экспериментально.

Рис. 2. Ионообменная хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе в градиенте концентрации  $K_2HPO_4$  смеси, содержащей GMP, GDP, ppppG и радиоактивный продукт, отщепленный от аффинно меченой ДНК кислотным гидролизом. Контроль по поглощению (1) и радиоактивности (2). Условия хроматографии описаны в работе [5]



Описанный в настоящем сообщении подход к сверхселективному аффинному мечению промотора открывает новые возможности для исследования функциональной топографии транскрипционного комплекса.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Грачев М. А., Мустаев А. А., Курбатов В. А., Сазонов И. Т., Сафронов И. В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1525–1534.
2. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886–894.
3. Серпинский О. И., Каргинова Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Опикенко А. И., Плетнев А. Г., Митина Ю. Л. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 840–847.
4. Смирнов Ю. В., Липкин В. М., Овчинников Ю. А., Грачев М. А., Мустаев А. А. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 7. С. 1113–1116.
5. Grachev M. A., Mustaev A. A. // FEBS Lett. 1982. V. 137. № 1. P. 89–94.
6. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
7. Гринева Н. И., Мызина С. Д. // Молекуляр. биология. 1975. Т. 9. С. 502–508.

Поступило в редакцию  
20.X.1986

#### HIGHLY SELECTIVE AFFINITY LABELLING OF A PROMOTER IN A COMPLEX WITH THE *E. COLI* RNA POLYMERASE BY ALKYLATING DERIVATIVES OF INITIATING SUBSTRATES

GRACHEV M. A., LUKHTANOV E. A., MUSTAEV A. A.

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

The complex [promoter A<sub>2</sub>-*E. coli* RNA polymerase] was treated with phosphoamides, derivatives of 4-[N-methyl, N-(2-chloroethyl)]-aminobenzylamine and guanosine-5'-mono-, di-, and triphosphates with the alkylating group attached to the terminal phosphates. After this, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP was added. Residues of the affinity reagents bound covalently at the first stage were elongated by radioactive -pC residues due to the catalytic action of the active centre of RNA polymerase. Affinity labelled were  $\beta$ - and  $\sigma$ -subunits of the enzyme, and the promoter. The affinity label was localized on -pGpC residues. A guanine residue was alkylated in the promoter as suggested by radioactivity elimination kinetics. As the data obtained and the previously known length of the reagent (maximum distance between the  $\alpha$ -phosphorus atom of the reagent and the point of alkylation is less than 0.6 nm) indicate, there is a direct rather than protein-mediated contact between the template and the substrate within the complex [promoter-RNA polymerase].