



УДК 547.962.04

МОДИФИКАЦИЯ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА В ДНК-ЗАВИСИМОЙ  
РНК-ПОЛИМЕРАZE *E. COLI**Дипкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю.,  
Кочергинская С. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва**Никифоров В. Г., Лебедев А. Н.**Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

С помощью лактопероксидазы осуществлено иодирование остатков тирозина, находящихся на поверхности молекул минимального фермента РНК-полимеразы (фермента, не содержащего  $\sigma$ -субъединицы) и ее отдельных изолированных субъединиц. Число модифицированных аминокислотных остатков определено по числу радиоактивных пятен на пептидных картах. Показано, что при иодировании минимального фермента модифицируются 4 из 43 остатков тирозина в  $\beta$ -субъединице: 3 из 33 — в  $\beta'$ -субъединице и 2 из 5 — в  $\alpha$ -субъединице. В случае отдельных изолированных  $\beta$ -,  $\beta'$ - и  $\alpha$ -субъединиц иодируются соответственно 14, 8 и 4 остатков тирозина, что свидетельствует о большой площади взаимного контакта между субъединицами в составе молекулы РНК-полимеразы. Определено пространственное положение остатков тирозина в молекуле  $\alpha$ -субъединицы: Tyr<sup>68</sup> и Tyr<sup>227</sup> расположены на поверхности молекулы минимального фермента, Tyr<sup>152</sup> и Tyr<sup>185</sup> — в области контакта с другими субъединицами, Tyr<sup>177</sup> — внутри глобулы  $\alpha$ -субъединицы.

Процесс транскрипции генетической информации осуществляется ДНК-зависимой РНК-полимеразой (нуклеозидтрифосфат: РНК-нуклеотидилтрансфераза; КФ 2.7.7.6) [1]. Для понимания механизма каталитического действия этого фермента, а также механизмов регуляции транскрипции необходимо детальное изучение структуры и пространственной организации его молекулы. Одним из аспектов взаимосвязи структуры и функции является исследование динамики пространственной структуры фермента в процессе его функционирования. Составная часть этой работы — выяснение топографии самой молекулы фермента, т. е. изучение взаимного расположения субъединиц, выявление аминокислотных остатков, находящихся на поверхности и внутри молекулы белка.

Настоящая работа посвящена изучению пространственного расположения остатков тирозина в молекуле минимального фермента РНК-полимеразы. С помощью химической модификации (иодирования) и последующего анализа пептидных карт субъединиц фермента определено число остатков тирозина, расположенных на поверхности молекул РНК-полимеразы

и в области контакта между субъединицами. Для того чтобы исключить возможность модификации аминокислотных остатков, расположенных внутри белковой глобулы, проводилось ферментативное иодирование  $^{125}\text{I}$  остатков тирозина с помощью лактопероксидазы [2, 3].

Лактопероксидаза (КФ 1.11.1.7) осуществляет иодирование тирозиновых остатков белков в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{I}^-$ . Эта реакция протекает в основном за счет непосредственного взаимодействия лактопероксидазы с иодируемым белком, а не за счет химического иодирования с помощью образующегося под действием лактопероксидазы  $\text{I}_2$ . В результате иодируются лишь те тирозиновые остатки, которые располагаются на поверхности белка и доступны для лактопероксидазы [2].

Чтобы исключить возможное влияние иодирования на структуру РНК-полимеразы, мы проводили иодирование в условиях, когда на молекулу РНК-полимеразы вводилось не более 0,15 атома иода. Выбор таких условий определялся еще и тем, что при больших степенях иодирования образуются не только моноиод-, но и диiodтирозины [4]. Наличие же двух типов модифицированных остатков осложнило бы последующий анализ пептидных карт.

Иодированные препараты минимального фермента разделяли на отдельные субъединицы с помощью электрофореза на ацетате целлюлозы [5]. Число модифицированных остатков тирозина в каждом препарате субъединиц определяли по числу радиоактивных пятен на их пептидных картах. Эксперименты проводили в два этапа. Вначале анализировали пептидные карты триптического гидролизатов. Поскольку при триптическом гидролизе субъединиц РНК-полимеразы наблюдалось образование значительного числа высокомолекулярных пептидов, остающихся в точке нанесения на пептидной карте, проводилось дополнительное расщепление триптических пептидов протеазой из *Staphylococcus aureus* с последующим анализом пептидных карт полученных гидролизатов. Выбор этой протеазы обусловлен ее уникальной способностью гидролизовать в основном связи, образованные остатками глутаминовой кислоты [6].

Таблица 1

Результаты иодирования отдельных субъединиц и минимального фермента РНК-полимеразы *E. coli*

Субъединицы	Количество тирозинов *, моль/моль		
	общее [7]	модифицированных при иодировании	
		минимального фермента	субъединиц
$\alpha$	5	2(40)	4(80)
$\beta$	43	4(9,3)	14(32,6)
$\beta'$	33	3(9,1)	8(24,2)
$\alpha_2\beta\beta'$	86	11(12,9)	—

\* В скобках указано содержание модифицированных тирозинов по отношению к общему их числу (%).

Результаты анализа пептидных карт  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц РНК-полимеразы, иодированных в индивидуальном состоянии и в составе минимального фермента, суммированы в табл. 1. Как видно из приведенных данных, только ограниченное число остатков тирозина экспонировано на поверхности молекулы РНК-полимеразы (для  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц менее 10% и для всего минимального фермента 12,9%). Это число значительно увеличивается в случае иодирования отдельных субъединиц, что свидетельствует либо о большой площади взаимного контакта между субъеди-

Характеристика тирозинсодержащих пептидов  $\alpha$ -субъединицы

Шифр пептида	Тип гидролиза *	Аминокислотная последовательность	Электрический заряд при pH 6,5
1	T	<sup>46</sup> Ile... <sup>60</sup> Glu-Ile-Asp-Gly-Val-Leu-His-Glu- <sup>68</sup> Tyr-Ser-Thr- <sup>71</sup> Lys	-2
1a	T+SP	Tyr-Ser-Thr-Lys	+1
2	T	<sup>151</sup> Gly-Tyr-Val-Pro-Ala-Ser-Thr- <sup>158</sup> Arg	+1
2	T+SP	Gly-Tyr-Val-Pro-Ala-Ser-Thr-Arg	+1
3	T	<sup>171</sup> Leu-Leu-Val-Asp-Ala-Cys- <sup>177</sup> Tyr-Ser-Pro-Val-Glu- <sup>182</sup> Arg	-1
3a	T+SP	Ala-Cys-Tyr-Ser-Pro-Val-Glu-Arg	0
3	T+SP	Leu-Leu-Val-Asp-Ala-Cys-Tyr-Ser-Pro-Val-Glu-Arg	-1
4	T	<sup>183</sup> Ile-Ala-Tyr-Asn-Val-Glu-Ala-Ala- <sup>191</sup> Arg	0
4a	T+SP	Ile-Ala-Tyr-Asn-Val-Glu	-1
5	T	<sup>272</sup> Ala-Glu-Ala-Ile-His-Tyr-Ile-Gly-Asp-Leu-Val-Gln- <sup>284</sup> Arg	0
5a	T+SP	Ala-Ile-His-Tyr-Ile-Gly-Asp	0

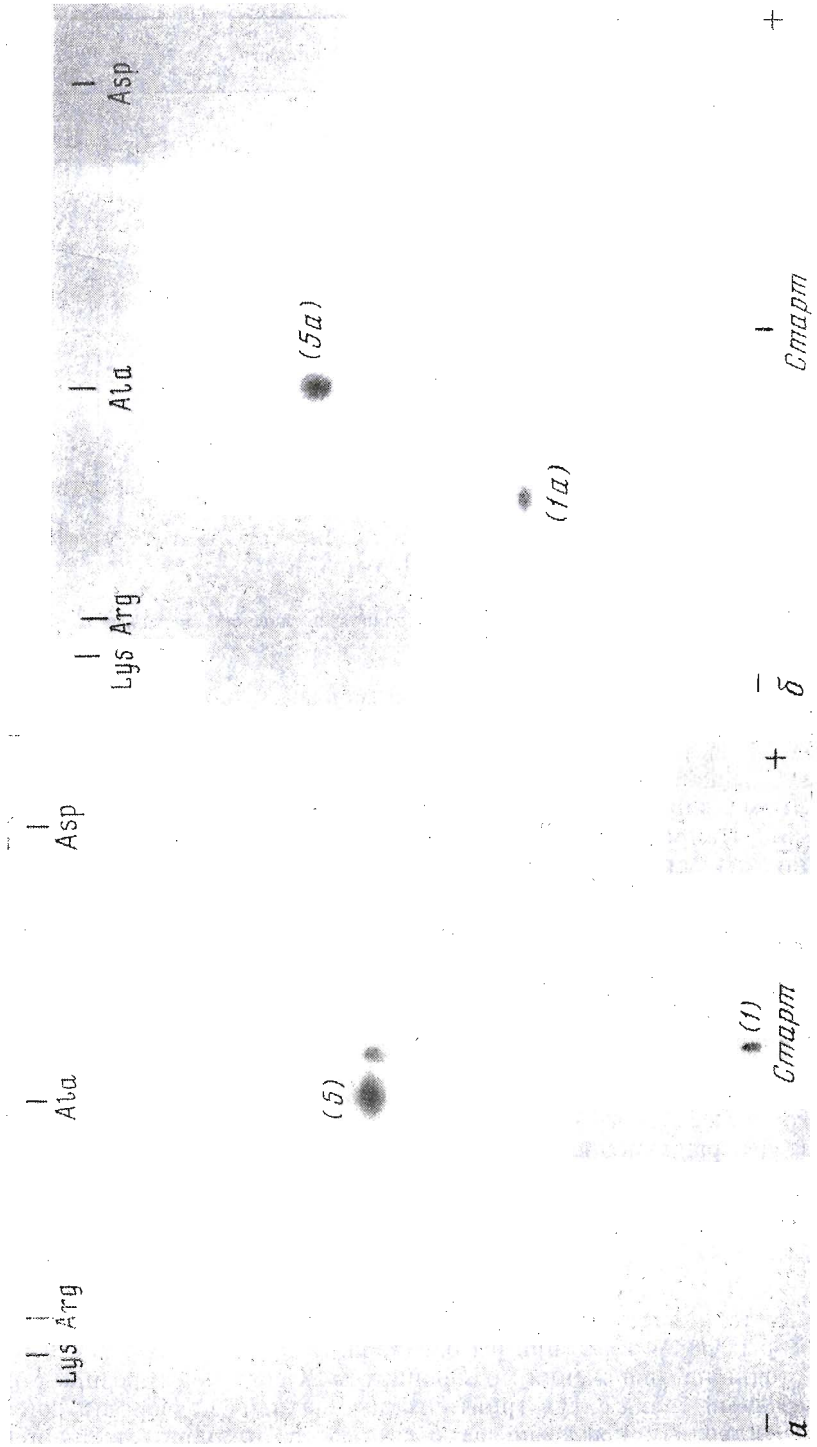
\* T — трипсин, T + SP — дополнительный гидролиз триптических пептидов протеазой из *St. aureus*.

ницами в составе молекулы РНК-полимеразы, либо о существенной конформационной перестройке субъединиц в процессе сборки активного фермента. Первое объяснение наблюдаемого явления кажется нам более вероятным, поскольку все остатки тирозина, модифицируемые при иодировании минимального фермента, также иодируются и в случае отдельных субъединиц. Например, все радиоактивные пятна на пептидных картах  $\alpha$ -субъединицы, полученной из иодированного минимального фермента, присутствуют на картах иодированной отдельной  $\alpha$ -субъединицы (ср. рисунок, а и б с в и г).

Знание первичной структуры  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы [8] позволило нам локализовать модифицируемые остатки тирозина в полипептидной цепи белка. Из триптического гидролизата  $\alpha$ -субъединицы были выделены все пять тирозинсодержащих пептидов [7], структура которых приведена в табл. 2 (пептиды 1—5).

На пептидной карте триптического гидролизата  $\alpha$ -субъединицы из иодированного минимального фермента с помощью автордиографии было обнаружено два радиоактивных пятна (рисунок, а). Одно из них находится в точке нанесения образца и, вероятно, соответствует высокомолекулярному пептиду (1) (остатки 46—71), поскольку ранее было показано, что этот пептид в используемых буферах не имеет электрофоретической и хроматографической подвижности в тонком слое целлюлозы. Второе пятно находится в области нейтральных пептидов и может соответствовать пептидам (4) (остатки 183—191) или (5) (остатки 272—284), электрический заряд которых равен нулю при pH 6,5 (табл. 2).

Для уточнения положения модифицируемых остатков тирозина в полипептидной цепи белка смесь триптических пептидов подвергали дополнительному гидролизу протеазой из *St. aureus* и повторно анализировали с помощью пептидной карты (рисунок, б). При этом было обнаружено два новых радиоактивных пятна, соответствующих нейтральному и положительно заряженному пептидам. Исходя из ранее изученной специфичности стафилококковой протеазы по отношению к  $\alpha$ -субъединице [9],



Lys Arg

Ala

Asp

Lys Arg

Ala

Asp

(5)

(1)

Смапм

(5a)

(1a)

Смапм

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

+

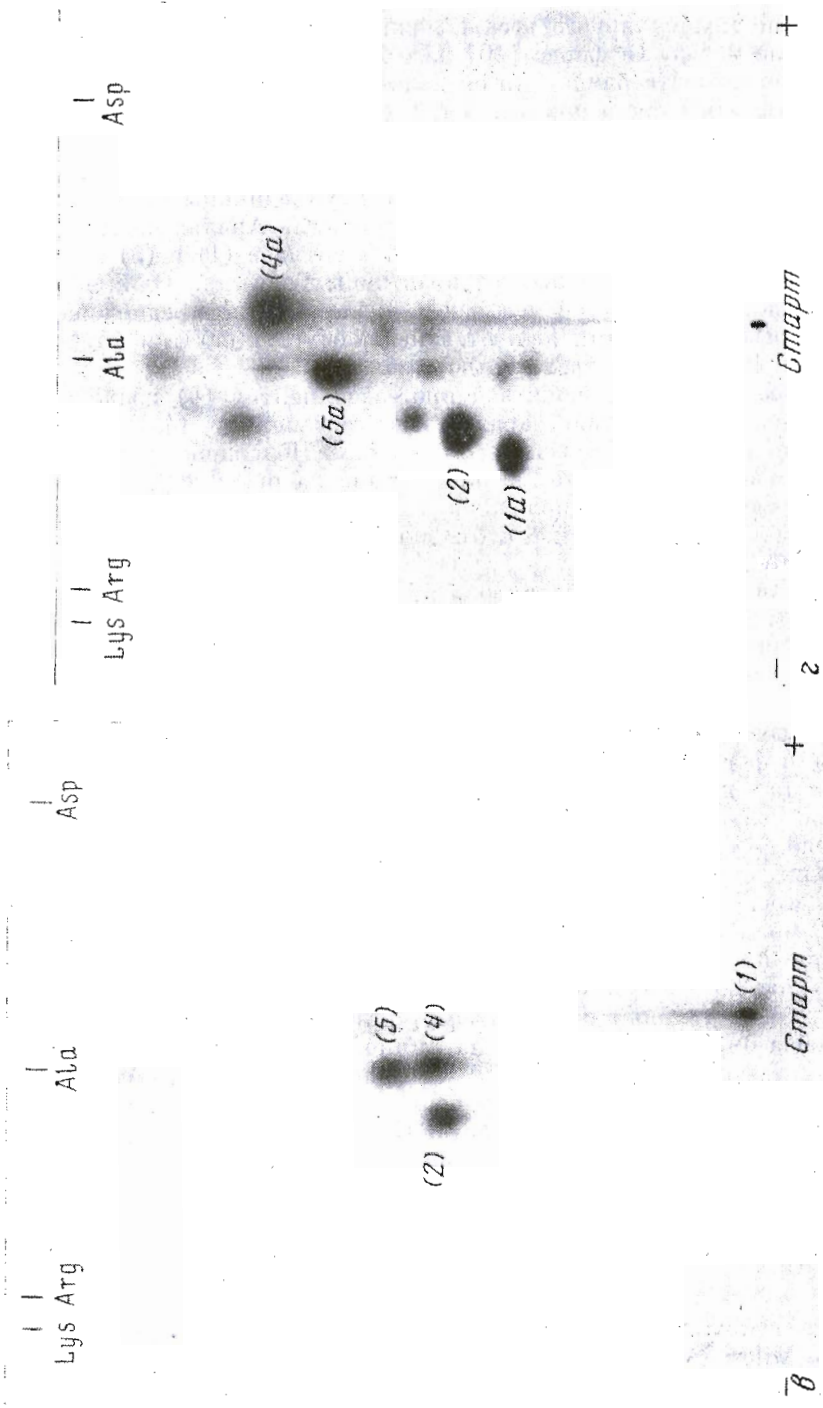
+

+

+

a

b



Радиоавтограммы пептидных карт  $\alpha$ -субъединицы (1 — электрофорез, 2 — хроматография) РНК-полимеразы, гидролизованной в составе минимального фермента (a, б) и в свободном состоянии (в, г) при гидролизе трипсином (a, в) и трипсином и протеазой из *St. aureus* (2, 4). В верхней части рисунка указана электрофоретическая подвижность аминокислот-стандартов. Отмечены положения пептидов

следовало, что при гидролизе этим ферментом из пептида (1) должен образоваться положительно заряженный тетрапептид (1а) (остатки 68—71), из пептида (4) — отрицательно заряженный гексапептид (4а) (остатки 183—188), а из пептида (5) — нейтральный гептапептид (5а) (остатки 274—280) (табл. 2).

Определение молекулярного веса положительно заряженного пептида (рисунок, б) по методу Оффорда [10] на основании его электрофоретической подвижности подтвердило, что он является тетрапептидом. Полученные результаты однозначно показывают, что при иодировании минимального фермента в  $\alpha$ -субъединице модифицируются остатки тирозина 68 и 277, находящиеся в триптических пептидах (1) и (5) соответственно.

На рисунке в приведена пептидная карта  $\alpha$ -субъединицы РНК-полимеразы, иодированной в индивидуальном состоянии. Анализ полученных данных показал, что кроме упомянутых выше пептидов (1) и (5) в гидролизате присутствовали два новых радиоактивных пептида. Один из них заряжен положительно, другой нейтрален. Было сделано предположение, что этими новыми пептидами являются пептиды (2) (остатки 151—158) и (4) (остатки 183—191) соответственно (табл. 2).

После гидролиза стафилококковой протеазой пептид (4) должен был превратиться в отрицательно заряженный гексапептид (4а) (остатки 183—188), а пептид (2) остаться неизменным. Положение радиоактивных пятен на пептидной карте, изображенной на рисунке г, полностью соответствует сделанным предположениям. Следовательно, при ферментативном иодировании отдельной  $\alpha$ -субъединицы модифицируются остатки тирозина 68, 152, 185 и 277.

При изучении триптических гидролизатов обоих препаратов  $\alpha$ -субъединицы на пептидных картах не было обнаружено радиоактивных пятен, соответствующих отрицательно заряженному пептиду (3) (остатки 171—182) (табл. 2), что указывает на недоступность остатка тирозина 177 для иодирования лактопероксидазой. Следовательно, в  $\alpha$ -субъединице РНК-полимеразы остатки тирозина 68 и 277 находятся на поверхности молекулы минимального фермента, остатки тирозина 152 и 185 расположены в области контакта с другими субъединицами, а остаток тирозина 177 локализован внутри молекулы  $\alpha$ -субъединицы.

Интересно, что остаток тирозина 277 расположен в полипептидной цепи  $\alpha$ -субъединицы в непосредственной близости от остатка аргинина 265 [8], подвергающегося модификации при инфицировании *E. coli* фагом T. Следовательно, можно предположить, что весь этот участок  $\alpha$ -субъединицы экспонирован на поверхности молекулы РНК-полимеразы. В этом же районе (остаток 289 или 290) [8] находится остаток лейцина, замещающийся остатком гистидина в результате мутации *groA109*.

Таким образом, применение метода химической модификации аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности РНК-полимеразы и ее субъединиц, позволило получить ценную информацию о пространственной организации молекулы фермента. В настоящее время проводятся аналогичные эксперименты по модификации цистеина, аргинина и других аминокислотных остатков РНК-полимеразы.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трипсин (Worthington, США), протеазу из *St. aureus* (Miles, Англия), лактопероксидазу (Boehringer, Mannheim, ФРГ). Минимальную РНК-полимеразу *E. coli* В выделяли по методике Бержеса [11]. Разделение субъединиц проводили как описано ранее [7].

*Приготовление иодированных препаратов субъединиц и минимальной РНК-полимеразы.* 100 мкг минимального фермента РНК-полимеразы (20 мкг в случае  $\alpha$ -субъединицы или 40 мкг —  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц) растворяли в 100 мкл буфера (0,02 М трис-НСl (рН 7,5); 0,3 М NaCl; 0,1 мМ  $H_2O_2$ ), добавляли  $Na^{125}I$  (уд. акт. 10 Ки/мг, из расчета 0,05 мКи на 10 мкг белка) и 1 мкг лактопероксидазы на 10 мкг иодируемого белка. Реакцию проводили в ледяной бане в течение 20 мин и останавливали добавлением дитиотреита (до 1 мМ). При этом в белок включалось не более 10% добавленной метки. В случае минимального фермента разделение иодированных субъединиц проводили с помощью электрофореза на ацетате целлюлозы, как описано в работе [5]. К полученной радиоактивно меченой субъединице ((1–5) · 10<sup>5</sup> имп/мин) добавляли 500 мкг соответствующей немеченой субъединицы в 400 мкл буфера (0,01 М трис-НСl (рН 8,0), 8 М мочевины, 0,1 мМ  $MgCl_2$ , 0,1 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, 0,1 М KCl). Полученный раствор обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (1 × 30 см), уравновешенным водным аммиаком (рН 10,0), и лиофилизировали.

*Получение пептидных карт.* Триптический гидролиз белка проводили в 0,1 М растворе  $NH_4HCO_3$  в течение 6 ч при 37° и соотношении фермент — субстрат 1 : 20. Гидролиз прекращали лиофилизацией. Дополнительный гидролиз триптического гидролизата протеазой из *St. aureus* осуществляли аналогичным образом. Пятую часть каждого гидролизата растворяли в 20 мкл буфера А (25 мл пиридина, 1 мл уксусной кислоты, 225 мл воды, рН 6,5) и наносили на пластинку с тонким слоем целлюлозы (20 × 20 см). На пластинку наносили также смесь аминокислот, содержащую по 2 нмоль Arg, Lys, Ala, Asp. Электрофорез проводили в буфере А в течение 30 мин при напряжении 1200 В и температуре 1–2°. После электрофореза пластинку высушивали и хроматографировали в перпендикулярном направлении в системе пиридин — уксусная кислота — бутанол — вода (10 : 3 : 15 : 12). Радиоавтографию проводили в течение 1–2 сут, пленка РМ-1. Пленку обрабатывали стандартным проявителем.

Авторы выражают благодарность акад. Ю. А. Овчинникову и чл.-кор. АН СССР Р. Б. Хесину за ценные замечания при обсуждении данной работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Chamberlin M. (1976) in: RNA Polymerase (Chamberlin M., Losick R., eds), pp. 17–67, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
2. Morrison M., Schonbaum A. R. (1976) Ann. Rev. Biochem., 861–889.
3. Никифоров В. Г., Лебедев А. Н., Камганова Н. Л. (1976) Тезисы докладов Советско-Западногерманского симпозиума по химии пептидов и белков, с. 90, М.
4. Davison P. F. (1976) Anal. Biochem., 75, 129–141.
5. Neil A., Zillig W. (1970) FEBS Lett., 11, 165–168.
6. Drapeau G. R., Boily Y., Houmard J. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6720–6726.
7. Модянов Н. Н., Липкин В. М., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Потапенко Н. А., Шуваева Т. М. (1978) Биоорг. химия, 4, 158–179.
8. Овчинников Ю. А., Липкин В. М., Модянов Н. Н., Чертов О. Ю., Смирнов Ю. В., Хохряков В. С., Шуваева Т. М. (1977) Биоорг. химия, 3, 283–286.
9. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Смирнов Ю. В., Чертов О. Ю., Хохряков В. С., Тюрин В. В., Потапенко Н. А. (1978) Биоорг. химия, 4, 180–196.
10. Offord R. E. (1966) Nature, 211, 591–593.
11. Burgess R. R. (1969) J. Biol. Chem., 244, 6155–6167.

Поступила в редакцию  
27.XI.1978

**MODIFICATION OF TYROSINE RESIDUES IN DNA-DEPENDENT RNA  
POLYMERASE FROM *E. COLI***

LIPKIN V. M., MODYANOV N. N., CHERTOV O. Yu., KOCHERGINSKAYA S. A.,  
NIKIFOROV V. G., LEBEDEV A. N.

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

A topographic study of RNA polymerase has been carried out by iodinating with lactoperoxidase of external tyrosine residues of the core enzyme (the enzyme devoid of  $\sigma$ -subunit) and of the individual subunits. The number of modified tyrosines was determined from the number of radioactive spots in peptide maps. Iodination of the core enzyme led to modification of 4 tyrosine residues in  $\beta$ -, 3 in  $\beta'$ - and 2 in  $\alpha$ -subunit. These numbers were augmented when each subunit was modified separately (14 in  $\beta$ -, 8 in  $\beta'$ - and 4 residues in  $\alpha$ -subunit, respectively), evidence of the considerable area of mutual contact between the subunits in the core enzyme molecule. The spatial location of  $\alpha$ -subunit tyrosine residues was determined: Tyr<sup>68</sup> and Tyr<sup>277</sup> are on the surface of the core enzyme, Tyr<sup>152</sup> and Tyr<sup>185</sup> are in the contact region with the other subunits, and Tyr<sup>177</sup> is buried within the  $\alpha$ -subunit globule.

---