



УДК 577.159.02+547.963.32.04

КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*
С ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫМИ АНАЛОГАМИ
ДЕКАТИМИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахламчева О. Г.,
Скиба Н. П., Липкин В. М., Модянов Н. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

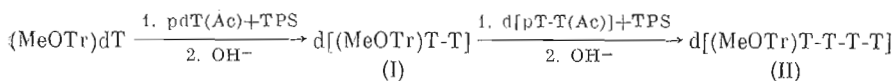
Осуществлено фотоиндуцированное ковалентное связывание ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* с декатимидиловыми матрицами, содержащими остаток 5-бромурацила. Показано, что под действием УФ-света эти олигонуклеотиды присоединяются в бинарном комплексе к β' -, β -, σ -субъединицам полного фермента и β' -, β -субъединицам минимального фермента, а в транскрипционном комплексе — в основном к β' -субъединице. α -Субъединица во всех случаях практически не затрагивается.

В последние годы значительно возрос интерес к изучению структуры и функции одного из ключевых ферментов клетки — ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*, однако до сих пор имеется ограниченное число данных с пространственной организацией этого белка, специфической функции его отдельных субъединиц и их взаимодействии. Одним из перспективных подходов к выяснению функциональной топографии этого фермента является применение фоточувствительных аналогов субстратов и матрицы для аффинного введения метки в субъединицы РНК-полимеразы [1–4], поскольку модификация аминокислот в результате ковалентного присоединения этих аналогов должна происходить скорее всего в функционально важных участках фермента, находящихся в тесном контакте с нуклеотидным материалом.

Настоящая работа является первым этапом наших исследований по установлению строения активного центра РНК-полимеразы, ответственного за связывание с ДНК, и посвящена изучению степени участия отдельных субъединиц этого фермента во взаимодействии с фотореактивными аналогами матрицы — декатимидиловыми кислотами, содержащими в определенном положении цепи остаток 5-бромурацила.

Возможность применения коротких тимидиловых полинуклеотидов, начиная с $(dT)_5$, в качестве матриц для синтеза полирибоаденилатов в присутствии РНК-полимеразы была показана ранее [5]. Скорость такой реакции возрастает с увеличением длины олиготимидилатов вплоть до $(dT)_{14}$, причем образующийся продукт, независимо от размеров матрицы, имеет длину цепи 50–100 мононуклеотидных звеньев. Хотя нет никаких

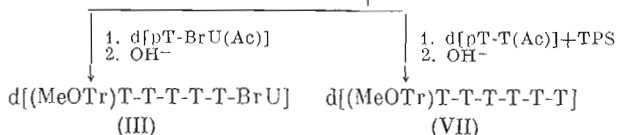
В работе использованы следующие нестандартные сокращения: TPS — 2,4,6-триэтилоксибензолсульфохлорид, TEAB — бикарбонат триэтиламония, SDS — додецилсульфат натрия.



(I)

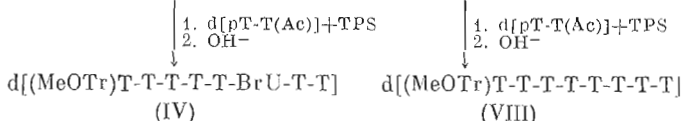
(II)

(II)



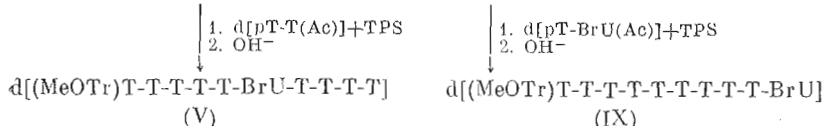
(III)

(VII)



(IV)

(VIII)



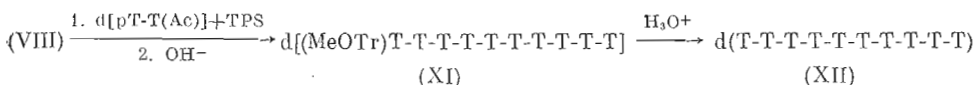
(V)

(IX)



(VI)

(X)



(XI)

(XII)

данных, что такой реинтеративный (скользящий) синтез гомополимеров происходит *in vivo*, изучение этой реакции может дать полезные сведения о механизме действия РНК-полимеразы и ее функциональной топографии. Кроме того, небольшие размеры и относительная доступность олиготимидилатов делают их удобным инструментом в подобного рода исследованиях. Так, Шайт и Фришауф использовали для аффинной модификации РНК-полимеразы гептадезоксигуанидин-4-тиоуридилатную кислоту [1]. Однако полиреактивность и ингибирующая способность этого аналога не позволили авторам сделать конкретные выводы об участии отдельных субъединиц фермента во взаимодействии с матрицей. Более удобны дезоксирибонуклеиновые кислоты, содержащие 5-бромурацил, которые, как известно, наряду с фоточувствительностью обладают функциональной активностью и в настоящее время достаточно широко применяются в структурно-функциональных исследованиях [6, 7].

Использованные в данной работе декануклеотиды $\text{d}(\text{T-T-T-T-T-BrU-T-T-T-T})$ (VI) и $\text{d}(\text{T-T-T-T-T-T-T-T-T-T-BrU})$ (X) также содержали остаток 5-бромурацила в качестве фотореактивной группы. Причем введение в эти олигонуклеотиды только по одному фоточувствительному остатку было сделано с целью уменьшения вероятности спивания матрицы одновременно с несколькими субъединицами, как это имело место в экспериментах работы [1].

Соединения (VI) и (X), а также немодифицированная декатимидиловая кислота (XII) были получены классическим фосфодиэфирным методом [8], согласно приведенной схеме. Структура олигонуклеотидов (VI), (X) и (XII) после 5'-фосфорилирования с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-полинуклеотидкиназы [9] подтверждена частичным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим фингерпринтированием по методу Сенгера [10]. Как видно из нуклеотидных карт на рис. 1, замещение тимина на 5-бромурацил изменяет (увеличивает) сдвиг в местах отрыва

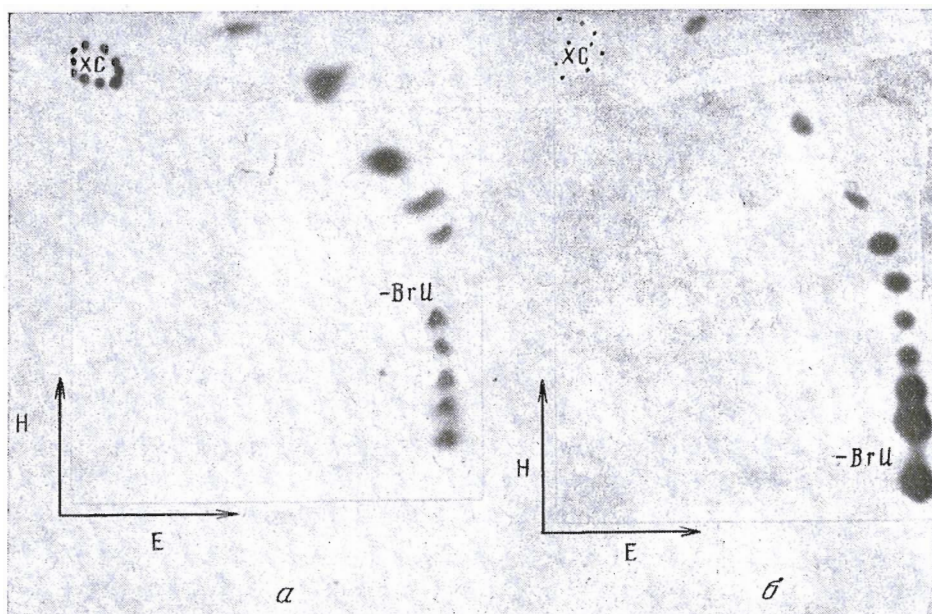


Рис. 1. Двухмерное разделение продуктов частичного гидролиза меченых олигонуклеотидов $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -(VI) (а) и $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -(X) (б) фосфоэстеразой змеиного яда: направление E – электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3,5; направление H – гомохроматография на DEAE-целлюлозе. ХС – пятно ксиленианола FF, (-BrU) – сдвиг при отрыве 5-бромдезоксиуридин-5'-фосфата

5-бромдезоксиуридин-5'-фосфата по сравнению со сдвигом при отрыве рdT, что согласуется с данными работы [11] и позволяет однозначно идентифицировать положение этого мононуклеотида в цепи.

Проверка матричной активности полученных олигонуклеотидов показала, что они являются подходящими матрицами для РНК-полимеразы. Синтез рoу(A) проходил на них примерно с такой же эффективностью, как и на (dT)₁₀, которая была в 3–5 раз выше, чем при использовании денатурированной ДНК тимуса теленка (см. табл. 1).

Прежде чем приступить к исследованию фотохимической реакции между РНК-полимеразой и соединениями (VI) и (X), мы изучили влияние УФ-света с максимумом 254 нм на каждый компонент в отдельности. Нами обнаружено, что под действием иррадиации РНК-полимераза в отсутствие матрицы постепенно теряет ферментативную активность и в использованных нами условиях (мощность лампы 45 Вт, расстояние 7 см) утрачивает ее практически полностью уже за 30 мин. Прибавление к ферменту аденозинтрифосфата несколько замедляет этот процесс – вероятно, за счет снижения дозы лучистой энергии, падающей на белок (см. рис. 2). Следует отметить, что параллельно с понижением активности наблюдалось постепенное уменьшение интенсивности окрашивания кумасси зон субъединиц на полиакриламидном геле, что, по-видимому, свидетельствует о деструкции белка при УФ-облучении.

Далее мы изучали действие УФ-света на 5-бромдезоксиуридинсодержащие олигонуклеотиды. Известно, что образующийся из 5-бромурацила при облучении в результате дебромирования радикал способен стабилизироваться двумя способами. Во-первых, за счет отрыва атома водорода от ближайшего остатка дезоксирибозы, что приводит в конечном счете к расщеплению в этом месте межнуклеотидной связи, а во-вторых, как это происходит при контакте с белком, путем взаимодействия с находящейся в непосредственной близости аминокислотой с образованием ковалентной связи между двумя биополимерами [6]. Мы установили, что деградация

Таблица 1

Активность РНК-полимеразы *E. coli* в синтезе poly(A)

Матрица	Активность фермента, ед/мг	
	Полный фермент	Минимальный фермент
Денатурированная тимусная ДНК	560	320
Нативная тимусная ДНК	350	480
d(T-T-T-T-BrU-T-T-T) (VI)	2080	2250
d(T-T-T-T-T-T-T-BrU) (X)	1950	2310
d(T-T-T-T-T-T-T-T) (XII)	1870	2060

* Соотношение матрица — фермент 300:1 (моль/моль).

Таблица 2

Распределение ³²P-меченого олигонуклеотида между субъединицами РНК-полимеразы *E. coli**

РНК-полимераза	Субъединицы	Вхождение метки, % **	
		в присутствии АТР (0,3 мМ)	в отсутствие АТР
Минимальный фермент	α	<1	<1
	β	25	45
	β'	75	55
Полный фермент	α	<1	<1
	β	20	20
	β'	75	25
	σ	5	50

* Соотношение олигонуклеотид — РНК-полимераза 2:1 (моль/моль). Приведены усредненные результаты из пяти экспериментов.

** Рассчитывается от общего количества радиоактивности, вошедшего в фермент.

олигонуклеотидов (VI) и (X) в упомянутых выше условиях облучения протекает медленнее, чем дезактивация РНК-полимеразы, и достигает ~50% в течение 40 мин (см. рис. 2).

Изучение продуктов фотохимической реакции взаимодействия РНК-полимеразы с аналогами декатимидиловой кислоты проводили с помощью электрофореза в 7% полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия [12], с использованием 5'-³²P-меченых препаратов олигонуклеотидов. Модифицированные субъединицы обнаруживали с помощью радиоавтографии.

В ходе исследований было показано, что облучение РНК-полимеразы УФ-светом в присутствии соединений (VI) и (X) приводит к образованию ковалентных связей отдельных субъединиц фермента с олигонуклеотидами, устойчивых к действию высокой солевой концентрации (1 М КСl) и детергента. Способность РНК-полимеразы давать ковалентную связь с декатимидилатами, содержащими 5-бромурацил, является свойством нативного фермента в условиях, благоприятных для образования комплекса с олигонуклеотидом, т. е. при достаточно низкой ионной силе (0,02—0,04 М). При использовании в контрольных опытах денатурированного фермента или бычьего сывороточного альбумина, а также при повышенной солевой концентрации (более 0,12 М) сшивки под действием УФ-облучения не наблюдалось. Немодифицированная декатимидиловая кислота (XII) в аналогичных условиях не пришивалась, что свидетельствует в пользу образования ковалентной связи в местах расположения УФ-чувствительного гетероцикла 5-бромурацила. Эффективность включения метки в РНК-полимеразу достигала максимума при облучении ее комплексов

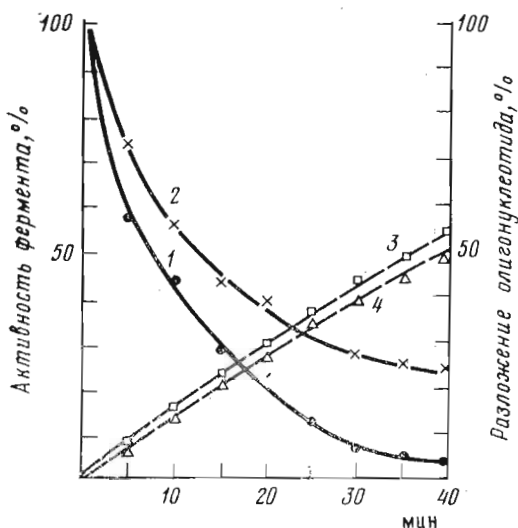


Рис. 2. Действие УФ-облучения на РНК-полимеразу *E. coli* и декатимидилаты, содержащие 5-бром урацил. Зависимость изменения активности РНК-полимеразы от времени действия УФ-света: 1 — без АТФ, 2 — с АТФ (за 100% принимали активность необлученного фермента на матрице (dT)₁₀). Кинетика деградации олигонуклеотидов 5'-³²P-(VI) (3) и 5'-³²P-(X) (4) под действием УФ-света

с модифицированными декатимидилатами в течение 15 мин. При более длительном облучении наблюдалось образование сшивки между различными субъединицами, о чем свидетельствовало появление радиоактивной белковой зоны на входе в полиакриламидный гель:

При изучении фотоиндуцированного ковалентного связывания РНК-полимеразы с олигонуклеотидами, содержащими 5-бром урацил, были установлены следующие закономерности. При использовании полного фермента эффективность сшивки в целом уменьшается в ~5 раз по сравнению с минимальной РНК-полимеразой. В 2 раза более эффективным оказалось применение декануклеотида (VI), чем декануклеотида (X). При увеличении соотношения олигонуклеотид — РНК-полимераза также наблюдалось повышение включения радиоактивности в субъединицы фермента. Так, при переходе от соотношения 1:1 к 10:1 (моль/моль) количество принятого декатимидилата увеличивалось в 3—4 раза.

Распределение метки между субъединицами РНК-полимеразы зависит от того, полный или минимальный фермент был введен в реакцию, а также от присутствия в среде аденозинтрифосфата. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 2. При облучении полного фермента и олигонуклеотида (VI) или (X) в отсутствие АТФ метится в основном σ -субъединица и в меньшей степени β' - и β -субъединицы. Если же УФ-облучение происходит в транскрипционном комплексе, т. е. в присутствии АТФ, картина резко меняется: количество метки в σ -факторе снижается практически в 10 раз, в случае β' -субъединицы увеличивается и достигает ~75% от общего количества радиоактивности, вошедшего в фермент; процент метки β -субъединицы остается практически на том же уровне. Распределение метки между субъединицами минимального фермента несколько иное, хотя тенденция преимущественной модификации β' -субъединицы в присутствии АТФ сохраняется. α -Субъединица во всех случаях остается немеченой (см. рис. 3).

С целью локализации мест присоединения олиготимидиловых кислот к РНК-полимеразе мы изучили распределение радиоактивной метки между бромциановыми пептидами, полученными из индивидуальных субъединиц. Для этого фермент после проведения УФ-сшивки был разделен с помощью гель-электрофореза на отдельные субъединицы [13], которые элюировали с геля. Из полученных препаратов удаляли SDS и проводили расщепление бромцианом. Образовавшуюся при этом смесь пептидов анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле. Было обнаружено, что только ограниченное число зон пептидного материала содержало радиоактивную метку: у β' -субъединицы — 3 пептида из 33 возможных, у β — 4 из

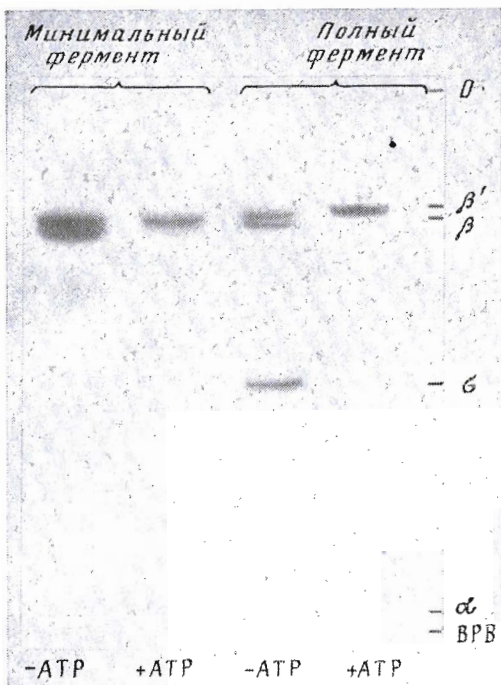


Рис. 3

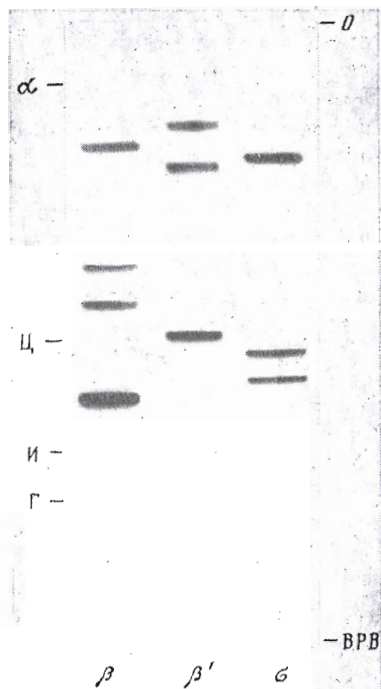


Рис. 4

Рис. 3. Радиоавтограф геля, полученного при разделении модифицированных субъединиц РНК-полимеразы. Электрофорез проводили при 30 мА в 7% разделяющем полиакриламидном геле (пластина 20×20×0,15 см), содержащем 0,375 М трис-НСl (рН 8,8), 0,1% SDS, с использованием 3% концентрирующего геля, содержащего 0,125 М трис-НСl (рН 6,8) и 0,1% SDS. В качестве электродного буфера взят 0,025 М трис, 0,192 М глицин, 0,1% SDS. Линиями показано положение белковых зон на геле, соответствующих субъединицам фермента: 0 – старт, ВРВ – бромфеноловый голубой

Рис. 4. Радиоавтограф, полученный при анализе продуктов бромцианового гидролиза модифицированных субъединиц РНК-полимеразы электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (пластина 20×20×0,1 см), содержащем 0,35 М трис-НСl (рН 8,8), 0,1% SDS, при 30 мА. 0 – старт, ВРВ – бромфеноловый голубой, Г, И, Ц и α – белки-стандарты, соответственно глюкогон, инсулин, цитохром с и α-субъединица

38 и у σ – 3 из 32, причем расположение радиоактивных зон было характерным для каждой субъединицы (рис. 4). Следует отметить, что распределение радиоактивной метки по бромциановым пептидам β'- и β-субъединиц было аналогичным в случае использования полного и минимального ферментов как в присутствии, так и в отсутствие АТР. Полученные результаты служат дополнительным подтверждением специфичности УФ-сшивки, а следовательно, дают возможность предположить, что при фотохимической реакции образуются связи 5-бромдезоксисуридинсодержащих декатимидилатов с участками РНК-полимеразы, ответственными за связывание ДНК-матрицы.

Недавно Окада и сотр. [3] описали фотохимическая ковалентная сшивка РНК-полимеразы с различными природными и синтетическими матрицами: с ДНК *E. coli*, 5-BrU-замещенной ДНК *E. coli* и poly[d(BrU-A)]. Для идентификации субъединиц РНК-полимеразы, образующих ковалентные связи с матрицей при УФ-облучении, авторы использовали уменьшение интенсивности окраски кумасси субъединиц в полиакриламидном геле после электрофореза в SDS облученного комплекса РНК-полимеразы с ДНК. Как было нами показано выше, при длительном облучении УФ-светом наблюдается деструкция субъединиц фермента, что заставляет

относиться с осторожностью к выводам этих авторов, поскольку уменьшение окраски субъединиц в полиакриламидном геле может отражать не столько связывание субъединиц с ДНК, сколько их разрушение. По этой причине, вероятно, данные Окада и сотр. об участии только больших β' - и β -субъединиц РНК-полимеразы в связывании полного фермента с ДНК отличаются от наших результатов. По-видимому, ошибочен также вывод о способности индивидуальной β -субъединицы наряду с β' -субъединицей образовывать прочный комплекс с ДНК, поскольку хорошо известно [14], что только β' -субъединица обладает сродством к ДНК.

Полученные нами результаты находятся в полном соответствии с данными Хиллела и Ву [15], которые обнаружили, что в условиях образования неспецифического бинарного комплекса между полным ферментом и ДНК фага Т7 [или poly(dA-T)] β' -, β - и σ -субъединицы ковалентно связываются с матрицей, в случае же минимального фермента в образовании неспецифического комплекса с ДНК принимают участие β' - и β -субъединицы. Однако в случае специфического бинарного комплекса полного фермента с ДНК фага Т7, а также в случае транскрипционного комплекса, синтезирующего короткие цепи РНК (смесь полного фермента с ДНК фага Т7, иницирующим динуклеотидом и тремя трифосфатами), по мнению этих авторов, только β - и σ -субъединицы, но не β' -субъединица взаимодействуют с ДНК, что противоречит результатам настоящей статьи. В этих случаях дифференциация между β - и β' -субъединицами была сделана на основании того, что при ограниченном триптическом гидролизе облученного комплекса РНК-полимеразы с ДНК фага Т7 не было обнаружено радиоактивной метки в районе полипептидов с M 120 000 и 50 000, которые, по данным Лава и Малькольма [16], образуются в результате гидролиза β' -субъединицы. Однако ранее было показано, что при мягком триптическом гидролизе комплекса РНК-полимеразы с ДНК с образованием вышеуказанных пептидов гидролизуется β -, а не β' -субъединица [17]. Кроме того, было обнаружено, что при обработке минимального фермента субтилизином β -субъединица распадается с образованием фрагментов с M 110 000 и 50 000 [18]. Таким образом, в экспериментах Хиллела и Ву в специфическом бинарном и транскрипционном комплексах, вероятно, β' -, а не β -субъединица связывается с ДНК фага Т7 при УФ-облучении. В этом случае наблюдается хорошая корреляция с данными по способности индивидуальной β' -субъединицы образовывать комплексы с ДНК и с обнаружением мутантов РНК-полимеразы с измененной β' -субъединицей, обладающих пониженным сродством к ДНК [19].

Таким образом, результаты настоящего сообщения показывают, что в случае бинарного комплекса в непосредственном контакте с матрицей находятся β' -, β - и σ -субъединицы, а в транскрипционном комплексе — в основном β' -субъединица и не наблюдается прямого взаимодействия σ -фактора с ДНК (что является еще одним доказательством освобождения σ -фактора из транскрипционного комплекса в процессе синтеза РНК [20]). В экспериментах с минимальным ферментом наблюдается аналогичная картина.

Более детальная локализация участков РНК-полимеразы, ответственных за связывание с матрицей, может быть проведена после анализа структуры пептидов, ковалентно связанных с олигонуклеотидами, что и предполагается осуществить в дальнейшем наряду с исследованиями взаимодействия этого фермента с синтетическими аналогами промотора G2 ДНК бактериофага *fd* [21].

Экспериментальная часть

В работе использована тимидиловая кислота производства СКТБ БАН Главмикробиоцентра (Новосибирск), pdB₃U и тимидин производства фирмы Sigma (США), TPS и трис (Merck, ФРГ), DEAE-целлюлоза DE-23

Таблица 3

Олигонуклеотид	5'-Р-компонент (ммоль)	3'-ОН-компонент (ммоль)	TPS, ммоль	Выход, %	E_{pdT}	λ_{max} ИРС, нм
d(pT-BrU)	pdBrU(Ac) (4,0)	(CNEt)pdT (2,0)	6,6	56	0,8	272
d(pT-T)	pdT(Ac) (20,0)	(CNEt)pdT (10,0)	50,0	60	0,9	267
(I) d[(MeOTr)T-T]	pdT(Ac) (12,0)	(MeOTr)dT (6,0)	30,0	75	2,0	267
(II) d[(MeOTr)T-T-T]	d[pT-T(Ac)] (1,46)	(I) (1,21)	6,2	62	1,3	267
(III) d[(MeOTr)T-T-T-BrU]	d[pT-BrU(Ac)] (0,82)	(II) (0,163)	3,4	48	1,0	268
(VII) d[(MeOTr)T-T-T-T]	d[pT-T(Ac)] (0,6)	(II) (0,24)	4,75	42	1,0	267
(IV) d[(MeOTr)T-T-T-T-BrU-T-T]	d[pT-T(Ac)] (0,3)	(III) (0,069)	2,2	47	0,7	267
(VIII) d[(MeOTr)T-T-T-T-T-T]	d[pT-T(Ac)] (1,2)	(VII) (0,075)	1,8	45	0,7	267
(V) d[(MeOTr)T-T-T-T-BrU-T-T-T]	d[pT-T(Ac)] (0,39)	(IV) (0,015)	1,0	65	0,4	267
(IX) d[(MeOTr)T-T-T-T-T-T-BrU]	d[pT-BrU(Ac)] (0,07)	(VIII) (0,007)	0,30	20	0,35	267
(XI) d[(MeOTr)T-T-T-T-T-T-T-T]	d[pT-T(Ac)] (0,08)	(VIII) (0,007)	0,40	35	0,35	267

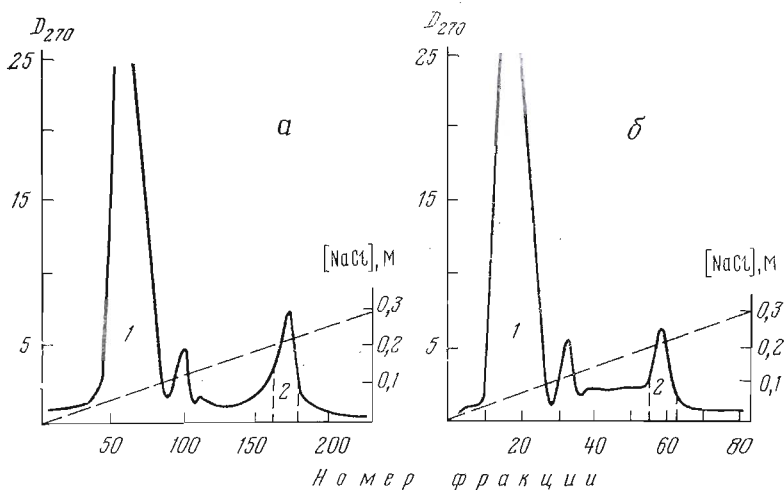


Рис. 5. Выделение защищенных декануклеотидов (V) (а) и (IX) (б): а – хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , 3×15 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine (0,01 М трис-HCl, pH 7,5), фракции по 6 мл/6 мин. Пик 1 содержит 4500 OE_{270} динуклеотида d(pT-T), пик 2 – 830 OE_{270} декануклеотида (V). б – хроматография на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , 1×12 см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine (0,01 М трис-HCl, pH 7,5), фракции по 4,5 мл/6 мин. Пик 1 содержит 1200 OE_{270} динуклеотида d(pT-BrU), пик 2 – 110 OE_{270} декануклеотида (IX)

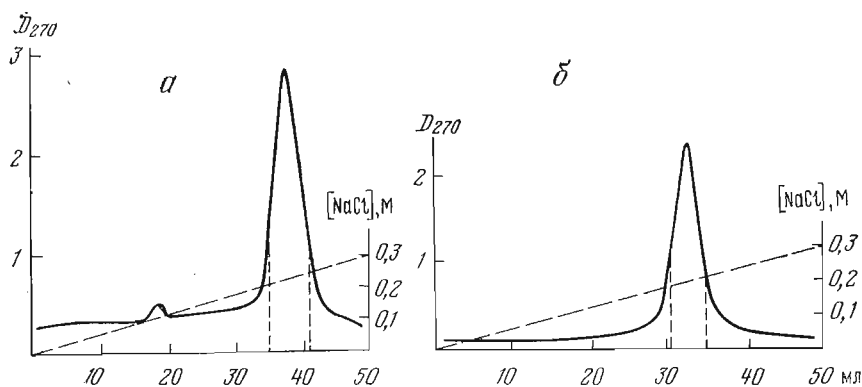


Рис. 6. Выделение декануклеотидов (VI) (а) и (X) (б) хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой (Cl^- , $0,5 \times 5$ см) в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine (0,01 М трис-HCl, pH 7,5): а – скорость элюции 20 мл/ч, центральная часть основного пика содержит 12 OE_{270} декануклеотида (VI); б – скорость элюции 15 мл/ч, центральная часть пика содержит 10 OE_{270} декануклеотида (X)

(для колоночной хроматографии), бумага № 1 и DEAE-бумага DE-81 фирмы Whatman (Англия), ацетилцеллюлоза (Schleicher und Schüll, ФРГ), целлюлоза MN-300 и DEAE-целлюлоза MN-300 (Serva, ФРГ), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ и $[\text{C}^{14}]\text{АТР}$ (Amersham, Англия), акриламид, N,N-метилебисакриламид (Bio-Rad, США), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.4) фирмы Worthington (США). Полинуклеотидкиназа Т4 была выделена по методу [22]. Радиоактивность определяли с помощью сцинтилляционного счетчика Marck II (Nuclear Chicago, США). Хроматографию на бумаге Ватман № 1 проводили в системе этанол – 1 М ацетат аммония, 7:3 (pH 7,5). $5'\text{-}^{32}\text{P}$ -меченые препараты олигонуклеотидов (удельная радиоактивность 25–50 мкКи/пмоль) получали с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ и полинуклеотидкиназы Т4 по методу Ричардсона [9].

Облучение препаратов УФ-светом проводили при 20°С тремя лампами БУФ-15 (ртутная лампа низкого давления, мощность 15 Вт) с расстояния 7 см на полоске парафиля (American Can Comp., США) в объеме 50–100 мкл. Интенсивность светового потока в этих условиях при 254 нм была определена с помощью уридиновой актинометрии по методу Ванга [26] и соответствовала $40 \cdot 10^3$ эрг/мм²·мин.

ДНК-зависимая РНК-полимераза E. coli (полный и минимальный фермент) была выделена из клеток *E. coli* MRE-600 по методу Бургеса [23], причем стадия очистки фермента на колонке с ДНК-целлюлозой была заменена хроматографией на ДНК-агарозе [24]. Препараты фермента хранили при –20°С в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl (рН 7,9), 0,5 М NaCl, 0,1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 50% глицерин. Активность ферментов (450 и 440 ед/мг соответственно для полного и минимального ферментов) определяли с использованием в качестве матрицы ДНК тимуса теленка (Worthington, США), а его чистоту – электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле в SDS [12].

Химический синтез олиготимидиловых кислот осуществляли блочным фосфодиэфирным методом [8]. В табл. 3 приведены условия проведения межнуклеотидных конденсаций, выходы, а также некоторые характеристики полученных соединений. Монометокситрилитсодержащие динуклеотид (I) и тетра-нуклеотид (II) были выделены избирательной экстракцией органическими растворителями из водных растворов, а остальные олигонуклеотиды – хроматографией на DEAE-целлюлозе (рис. 5). Структуру конечных олигонуклеотидов после удаления монометокситрилитной группы 80% уксусной кислотой (1 ч при 20°С) и очистки хроматографией в 7 М мочеvine при рН 7,5 (см. рис. 6) подтверждали фингерпринтированием 5'-³²P-меченых препаратов по методу Сигера [10]. Радиоавтограммы полученных при этом цуклеотидных карт декануклеотидов (VI) и (X) приведены на рис. 1.

Проверку матричной активности декануклеотидов (VI), (X) и (XII) проводили в буфере, содержащем 0,02–0,04 М трис-НСl (рН 7,9), 0,01 М MgCl₂, 0,3 мМ [¹⁴C]АТР (3,3 мКи/ммоль), 1 мМ DTT, 0,5 мг/мл альбумина. В пробу 50 мкл вносили 600 пмоль декануклеотида (либо 14 мкг ДНК тимуса теленка) и 2 пмоль (1 мкг) РНК-полимеразы и инкубировали 30 мин при 20°С. Затем пробы наносили на квадратики (1,7×1,7 см) DEAE-бумаги, промывали их 0,2 М Na₂HPO₄ (из расчета 5 мл раствора на квадрат), водой, спиртом, высушивали и просчитывали в толуольном оцинтиллаторе.

Влияние УФ-света на активность РНК-полимеразы. а) в присутствии АТР: пробу в 50 мкл, содержащую 0,02 М трис-НСl-буфер (рН 7,9), 0,01 М MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 0,3 мМ [¹⁴C]АТР и 2 мкг фермента, облучали УФ-светом в течение 5–40 мин, затем прибавляли (dT)₁₀ (600 пмоль) и определяли активность фермента, как описано в опыте 3; б) в отсутствие АТР: проба в 50 мкл содержала тот же буфер, что и в опыте 4а, кроме АТР; после облучения прибавляли (dT)₁₀, [¹⁴C]АТР и определяли активность фермента. Полученные при этом результаты приведены на рис. 2.

Действие УФ-облучения на модифицированные декагемидилаты. 1 нмоль 5'-³²P-меченого соединения (VI) или (X) растворяли в 200 мкл 0,02 М трис-НСl (рН 7,9) и помещали под УФ-лампу. Каждые 5 мин отбирали аликвоты по 20 мкл и наносили их на пластинку с DEAE-целлюлозой, пластинку подвергали гомохроматографии в гомосмеси 6 [25] и радиоавтографировали. Радиоактивные пятна, соответствующие исходным декамерам и продуктам их разложения, снимали с подложки и просчитывали в толуольном сцинтиллаторе. Полученные результаты приведены на рис. 2.

Фотоиндуцированное сшивание РНК-полимеразы с олигонуклеотидами проводили в буфере, содержащем 0,04 М трис-НСl (рН 7,9), 0,01 М MgCl₂,

2,5 мМ DTT, 5% глицерин и 0,3 мМ АТФ*. 10 мкг (20 пмоль) РНК-полимеразы *E. coli* и 40 пмоль 5'-³²P-декануклеотида (VI) или (X) инкубировали 10 мин при 30°С в 50 мкл связывающего буфера, затем инкубационную смесь облучали УФ-светом в стандартных условиях в течение 15–20 мин и прибавляли 25 мкл 126 мМ трис-НСl (рН 6,8) в 20% глицерине, содержащем 3% SDS, 5% меркаптоэтанола и 0,002% бромфенолового голубого. Смесь прогревали при 100°С 1–2 мин и наносили на 7% полиакриламидный гель. Условия проведения гель-электрофореза приведены на рис. 3. Для определения относительного количества олигонуклеотида, ковалентно связанного с различными субъединицами фермента, гель радиоавтографировали, радиоактивные зоны вырезали и просчитывали на счетчике.

Расщепление модифицированных субъединиц РНК-полимеразы бромцианом. Субъединицы, содержащие ковалентно присоединенные 5'-³²P-меченые декануклеотиды (~30 мкг белка), элюировали с полиакриламидного геля после проведения электрофореза [13] раствором, содержащим 0,01 М трис-НСl (рН 8,8)/0,1% SDS и 50 мкг соответствующей лиофилизованной субъединицы, элюат лиофилизовали, сухой остаток промывали 90% водным ацетоном (4×2 мл) для удаления SDS, белковый материал растворяли в 200 мкл 70% муравьиной кислоты и прибавляли ВrCN (~500-кратный избыток на 1 моль метионина в белке). Реакцию проводили в течение 18 ч при 20°С, затем к гидролизату прибавляли 1 мл воды и раствор лиофилизовали. Остаток растворяли в 50 мкл буфера [6 М мочевины, 0,02 М трис-НСl (рН 6,8), 1% SDS, 0,2% меркаптоэтанол, 0,002% бромфеноловый голубой] и помещали на 20% полиакриламидный гель. Условия проведения электрофореза и радиоавтограмма полученной при этом картины приведены на рис. 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frischauf A. M., Scheit K. H. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1227–1233.
2. Armstrong V. W., Sternbach H., Eckstein F. (1976) *Biochemistry*, **15**, 2086–2091.
3. Okada M., Verge J., Brahm S. J. (1978) *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1845–1862.
4. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1278–1280.
5. Falaschi A., Adler J., Khorana H. G. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 190–195.
6. Ogata R., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4973–4976.
7. Lin S.-Y., Riggs A. D. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 947–951.
8. Sande J. H. van de, Caruthers M. H., Kumar A., Khorana H. G. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 571–586.
9. Richardson C. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **54**, 158–165.
10. Sanger F. (1973) in: *Virus Research* (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573–599, Acad. Press, New York—London.
11. Grigg G. W. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 969–988.
12. Laemmli U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680–689.
13. Harris J. D., Martinez I. I., Galender R. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1836–1840.
14. Sethi V. S., Zillig W. (1970) *FEBS Lett.*, **6**, 339–342.
15. Hillel Z., Wu C.-W. (1978) *Biochemistry*, **17**, 2954–2961.
16. Lowe A., Malcolm D. B. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **64**, 177–188.
17. King A. M. Q., Lowe P. A., Nicholson B. H. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **59**, 38–43.
18. Никифоров В. Г., Лебедев А. Н., Каштанова Н. А. (1976) Тезисы СССР—ФРГ симпозиума по химии пептидов и белков, с. 90, Душанбе.
19. Panny S. R., Heil A., Mezus B., Palm P., Mindlin S. Z., Ilyna T. S., Khesin R. B. (1974) *FEBS Lett.*, **48**, 241–245.
20. Krakow J. S., Helm K. von der (1971) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 73–83.
21. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 138–144.
22. Panet A., Sande J. H. van de, Loewen P. C., Khorana H. G., Raac A. G., Lillehaug G. R., Kleppe K. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5045–5050.

* Прибавляли при изучении УФ-сшивки в транскрипционном комплексе.

23. Burgess R. R., Jendrisak J. J. (1975) *Biochemistry*, 14, 4634—4638.
24. Schaller H., Nusslein C., Bonhoeffer F. J., Kurz C., Nietzsche I. (1972) *Eur. J. Biochem.*, 26, 474—481.
25. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 331—353.
26. Wang S. Y. (1982) *Photochem. Photobiol.*, 1, 135—145.

Поступила в редакцию
27.III.1979

COVALENT CROSS-LINKING OF *E. coli* RNA POLYMERASE AND PHOTSENSITIVE ANALOGS OF DECATHYMIDYLIC ACID

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

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

It was shown that ultraviolet irradiation induces the formation of stable covalently bound complexes of RNA polymerase with decanucleotides d(T₅-BrU-T₄) and d(T₉-BrU) containing photoreactive residue of 5-bromouracil. To determine which particular subunit of RNA polymerase participates in the cross-linking with template, the use was made of 5'-[³²P]-labeled decanucleotides and SDS polyacrylamide gel electrophoresis. These oligonucleotides were found to be attached specifically: a) in binary complexes—to β', β, and σ subunits of holo-enzyme and β', β subunits of core-enzyme; b) in transcription complexes—mainly to β' subunit. α Subunit was essentially not attached to template.
