



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.1

О СТРУКТУРЕ РНК-ЛИГАЗНОГО — АДЕНИЛАТНОГО КОМПЛЕКСА

Юодка Б. А., Маркуцкас А. Я., Снечкуте М. А.,
Жилинскене В. Ю.

Вильнюсский государственный университет им. В. Капсукаса

Дрыгин Ю. Ф.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Известно [1—3], что РНК-лигаза катализирует АТР-зависимое сшивание олигонуклеотидов через три стадии. На первой стадии реакции образуется ковалентный РНК-лигазный—аденилатный комплекс, природа связи в котором неизвестна. Мы показали, что связь между РНК-лигазой и АМР является фосфоамидной.

РНК-лигазу выделяли из бактерий *E. coli*, зараженных фагами T4 am N82 по методике работы [3]. РНК-лигазный—аденилатный комплекс получали следующим образом: реакционную смесь, содержащую в 0,6 мл 41 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 8,3 мМ MgCl₂, 1 мМ диотреит, 44 мкМ [¹⁴C]АТР (уд. акт. 460 кКи/ммоль), 0,3 мл РНК-лигазы, инкубировали 20 мин при 22° С. Образовавшийся РНК-лигазный—аденилатный комплекс выделяли с помощью гель-фильтрации на колонке (0,9×56 см) с био-гелем Р 30 (50—150 меш). Элюцию проводили 42 мМ трис-НСl-буфером, рН 7,5, содержащим 1 мМ диотреит и 0,1 мМ EDTA (Na). К 2,1 мл комплекса (14 000 имп/мин) прибавили 0,4 мг протеиназы К (Merck, ФРГ) и инкубировали 14 ч при 22° С. Реакционную смесь наносили на хроматографическую бумагу Ватман 3ММ и проводили высоковольтный электрофорез в 50 мМ цитратном буфере, рН 5. Вещество (аденилилпептид) с электрофоретической подвижностью 1,3 по отношению к АМР элюировали подщелоченной аммиаком водой, рН 9. Элюат упаривали досуха, остаток растворяли в 60 мкл 15 мМ трис-НСl-буфера (рН 8), содержащего 3 мМ MgCl₂, прибавили 0,1 мг/мл фосфодиэстеразы змеиного яда (Worthington, США) и инкубировали 2 ч при 37° С. Реакционную смесь фракционировали с помощью электрофореза на бумаге, как описано выше. Оказалось, что аденилилпептид стабилен по отношению к фосфодиэстеразе змеиного яда. Фосфоэфирная связь в синтезированных в нашей лаборатории сложных эфирах нуклеотидил(5'→O)-N-Cbz-серина, -N-Cbz-треонина, -N-Bz-тирозина и -N-Cbz-оксипролина была лабильна по отношению к этому ферменту. Это позволило сделать вывод, что связь в аденилилпептиде не является фосфоэфирной.

Известно [4], что гидроксиламин при рН 5 специфически расщепляет фосфоамидную связь. Аденилилпептид (300 имп/мин) растворяли в 15 мкл 3,86 М NH₂OH (рН 4,8) и инкубировали 15 мин при 37° С. Ока-

залось, что в этих условиях гидроксилламин полностью расщепляет аденилпептид до адениловой кислоты. Полученные данные позволили сделать вывод, что связь в РНК-лигазном-аденилатном комплексе между РНК-лигазой и АМР является фосфоамидной. Этот вывод подтверждают и эксперименты, проведенные по модификации лизина в РНК-лигазе с помощью 2,4-пентадиона. В реакционную смесь, содержащую в 0,6 мл 20 мМ HEPES* (рН 7,6), 1 мМ β-меркаптоэтанол, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ KCl и 0,3 мл РНК-лигазы, прибавили 5 мкл 2,4-пентадиона и инкубировали 3 ч при 20°С. Реакционную смесь диализовали против 10 мМ HEPES, рН 7,6, содержащего 1 мМ диотреит, и проводили реакцию с [¹⁴C]АТР, как описано выше. Оказалось, что модифицированная РНК-лигаза практически не образует фермент-аденилатный комплекс. Гидроксилламин, регенерирующий модифицированный фермент, на 50% восстановил РНК-лигазную активность. Реакция модифицированного 2,4-пентадионом РНК-лигазного-аденилатного комплекса с неорганическим пирофосфатом привела к 75%-ному образованию АТР. Это свидетельствует о том, что модификация 2,4-пентадионом лизинов, не входящих в активный центр, мало влияет на активность фермента. Все эти данные позволяют предположить, что АМР присоединяется к РНК-лигазе с помощью фосфоамидной связи через лизиновый остаток фермента.

Благодарим сотрудника Всесоюзного научно-исследовательского института прикладной энзимологии Главмикробиопрома Р. Марцишаускаса за предоставленную биомассу бактерий *E. coli*, зараженных фагом T4 am N82.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cranston J. W., Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 7447-7456.
2. Kaufmann G., Kallenbach N. R. (1975) *Nature*, 254, 452-454.
3. Юодка Б. А., Слечкуте М. А., Янушоните Л. М.; Маркуцкас А. Я. (1979) *Биохимия*, 44, 599-604.
4. Юодка Б. А., Недбай В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1969) *Биохимия*, 34, 849-852.

Поступило в редакцию
26.V.1980

ON THE STRUCTURE OF THE RNA LIGASE-ADENYLATE COMPLEX

JUODKA B. A., MARKUCKAS A. Ya., SNECHKUTE M. A.,
ŽILINSKIENE V. J., DRIGIN Yu. F.

V. Kapsukas State University, Vilnius; M. V. Lomonosov State University, Moscow

The RNA ligase-[¹⁴C]adenylate complex has been isolated by means of gel-filtration. Proteinase K hydrolyzed the complex to adenylylpeptide which was stable with respect to snake venom phosphodiesterase, but was split by hydroxylamine. These facts and data on modification of the RNA ligase and its adenylyl complex by 2,4-pentanedione allowed to assume that adenylic acid is bound to the RNA ligase by the phosphoamide bond via a lysine residue of the enzyme.

* HEPES — N-2-оксизэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота.