



УДК 577.112.855

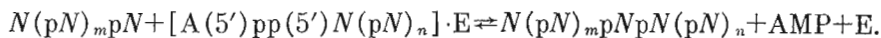
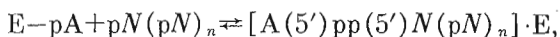
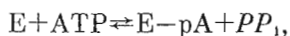
ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КОВАЛЕНТНОГО АМР-РНК-ЛИГАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Юодка Б. А., Маркуцкас А. Я.

*Вильнюсский государственный университет им. В. Капсукаса,
кафедра биохимии и биофизики*

Исследовано поведение ковалентного [³²P]- и [¹⁴C]АМР-РНК-лигазного комплекса в щелочи и кислоте, а также по отношению к гидроксилламину и фосфодиэстеразе змеиного яда. Показано, что эта ковалентная структура хорошо расщепляется кислотой, гидроксилламином и относительно стабильна по отношению к щелочи и фосфодиэстеразе змеиного яда. Установлены продукты расщепления АМР-РНК-лигазного комплекса и сравнены с таковыми в случае АМР-ДНК-лигазного аналога. Полученные данные подтверждают ранее выдвинутое предположение о фосфамидном типе связи в АМР-РНК-лигазном соединении.

В настоящее время выделена РНК-лигаза из прокариотических [1–3] и эукариотических [4–6] источников. Большинство известных РНК-лигаз катализируют АТР-зависимое сшивание или циклизацию олигонуклеотидов в три стадии:



На первой стадии реакции образуется промежуточное АМР-РНК-лигазное соединение с ковалентной связью между компонентами. Настоящее исследование посвящено изучению поведения АМР-РНК-лигазного комплекса по отношению к кислоте, щелочи, гидроксилламину и фосфодиэстеразе змеиного яда, сравнению гидролитической устойчивости АМР-РНК-лигазного комплекса с АМР-ДНК-лигазным аналогом в связи с уточнением природы ковалентной связи между АМР и РНК-лигазой.

Препарат Т4-РНК-лигазы, полученный из Вильнюсского научно-производственного объединения «Фермент», не был гомогенным, и необходимо было убедиться, что он не содержит примесных ферментов, способных образовать ковалентный комплекс в реакции с АТР. Для этого препарат РНК-лигазы инкубировали с [α -³²P]АТР и полученный меченый комплекс фракционировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. При окрашивании геля кумасси синим (рис. 1а) видно, что препарат РНК-лигазы содержит небольшие количества примесных белков, но автордиография показала, что в реакции с [α -³²P]АТР участвует лишь единственный фермент — РНК-лигаза (рис. 1б). Отсюда мы сделали вывод, что препарат РНК-лигазы не содержит примесных ферментов, способных образовать ковалентный АМР-ферментный комплекс в реакции с АТР.

Для исследования поведения АМР-РНК-лигазного соединения по отношению к химическим агентам и фосфодиэстеразе змеиного яда необходимо было выделить это соединение в препаративном количестве. Для этого [α -³²P]АТР инкубировали с Т4-РНК-лигазой и полученный [³²P]АМР-лигазный комплекс выделяли геле-фильтрацией на колонке с биогелем Р-30 (рис. 2). Инкубация вещества из пика 1 с пиррофосфорной кислотой приводила к образованию [³²P]АТР. Это было доказательством того, что в пике 1 на самом деле содержится комплекс [³²P]АМР-РНК-лигаза. Далее исследовали поведение ковалентного комплекса по отношению к кислоте (0,2 н. HCl, 10 мин, 70° С), щелочи (0,2 н. NaOH, 10 мин,

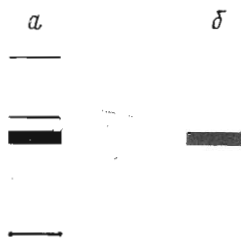


Рис. 1

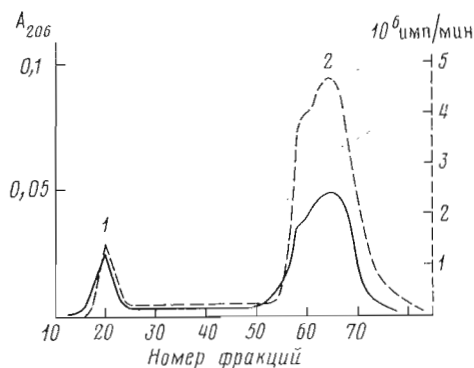


Рис. 2

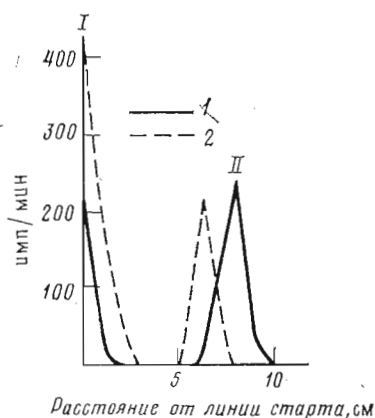


Рис. 3

Рис. 1. Схема фракционирования $[^{32}\text{P}]\text{AMP-RNase}$ -лигазного комплекса с помощью электрофореза в полиакриламидном геле: вид геля после окрашивания кумасси синим (а), радиоавтограф геля (б)

Рис. 2. Выделение $[^{32}\text{P}]\text{AMP-RNase}$ -лигазы с помощью гель-фильтрации на колонке с биогеом Р-30. 1 — $[^{32}\text{P}]\text{AMP-RNase}$ -лигаза, 2 — $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

Рис. 3. Фракционирование кислотного (0,15 н. HCl , 1 ч, 37°C) гидролизата $[^{14}\text{C}]\text{AMP-RNase}$ - (I) и $[^{14}\text{C}]\text{AMP-DНК}$ -лигазного (2) соединения с помощью хроматографии на бумаге. I — комплекс, II — $[^{14}\text{C}]\text{AMP}$

70°C), гидроксиламину (3,86 М, рН 4,8; 25 мин, 37°C) и фосфодиэстеразе змеиного яда (1 ч, 37°C). По окончании инкубации в реакционные смеси прибавляли холодную 5% трихлоруксусную кислоту, наносили на мембранные фильтры, промывали их водой и мерили радиоактивность. О степени расщепления связи между АМР и РНК-лигазой судили по уменьшению радиоактивности на мембранных фильтрах.

Из полученных данных видно, что АМР-РНК-лигазное соединение практически устойчиво в 0,2 н. NaOH (10 мин, 70°C) и по отношению к фосфодиэстеразе змеиного яда, но хорошо расщепляется в 0,2 н. HCl (на 93%) и 3,86 М гидроксиламине, рН 4,8 (на 96%).

Методика изучения гидролитической устойчивости $[^{32}\text{P}]\text{AMP-RNase}$ -лигазного комплекса не позволила определить продукты его расщепления в кислой среде. Для этой цели мы получали $[^{14}\text{C}]\text{AMP-RNase}$ -лигазный комплекс, его гидролизовали 0,15 н. HCl (1 ч, 37°C) и продукты гидролиза фракционировали с помощью хроматографии на бумаге (рис. 3). Нетрудно заметить, что в кислой среде АМР-РНК-лигазное соединение расщепляется только на 50%. Известно [7], что в случае АМР-ДНК-лигазного комплекса связь между АМР и ферментом фосфамидная. Интересно было сравнить гидролитическую устойчивость обоих АМР-РНК-лигазных комплексов. В аналогичных условиях АМР-ДНК-лигазный комплекс также расщепляется, но значительно медленнее и за 1 ч гидролизует на 12% (рис. 3).

Подробное исследование модельных нуклеотидпептидов с разными типами связи между нуклеотидным и пептидным компонентами показало [8, 9], что обычно нуклеотидпептиды фосфамидного типа хорошо расщепляются кислотами и гидроксиламином, но устойчивы в щелочи и по отношению к фосфодиэстеразам. Таким образом, полученные данные по гидролитической устойчивости меченого АМР-РНК-лигазного соединения,

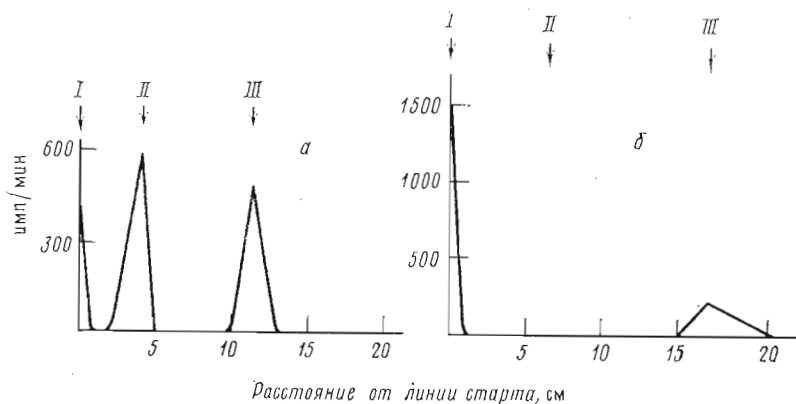
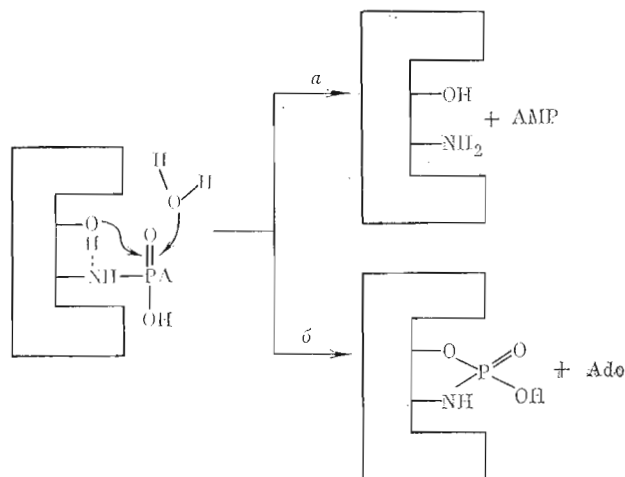


Рис. 4. Распределение радиоактивности при хроматографии на бумаге комплексов АМР-РНК-лигаза (а) и АМР-ДНК-лигаза (б) после их хранения в 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, в течение 11 сут при 10° С. Стрелками указано положение комплекса (I), [¹⁴С]АМР (II) и [¹⁴С]аденозина (III)

а также сравнение его поведения с гидролитическими свойствами АМР-ДНК-лигазного комплекса, в котором связь между АМР и ферментом известна, подтверждает выдвинутое нами ранее предположение [10] о фосфамидной природе связи между АМР и РНК-лигазой. Разная стабильность АМР-РНК-лигазных комплексов в кислой среде свидетельствует о том, что окружение фосфамидных связей в этих комплексах неодинаково.

Оказалось, что АМР-РНК- и ДНК-лигазные соединения неустойчивы при их хранении в 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 7,5. Мы исследовали продукты их расщепления (рис. 4). Выяснилось, что и в данном случае гораздо лабильнее АМР-РНК-лигазное соединение. После 11 сут при 10° С оно расщепляется на 75%, а АМР-ДНК-лигазный аналог — только на 21%. Интересно, что среди продуктов расщепления АМР-ДНК- и АМР-РНК-лигазных комплексов в первом случае обнаружен аденозин, во втором — аденозин и АМР. Исследование модельных нуклеотидпептидов фосфамидного типа показало [8, 9], что появление нуклеозидов в реакционной смеси обусловлено действием расположенных рядом с фосфамидным центром функциональных групп (гидроксильная, карбоксильная) аминокислот.

Таким образом, можно заключить, что АМР-РНК-лигазное соединение в водной среде расщепляется по двум направлениям:



Направление *a* — гидролиз водой связи между АМР и РНК-лигазой; направление *b* — внутримолекулярная нуклеофильная реакция с участием функциональной группы (на схеме показана гидроксильная группа) активного центра фермента. Уходящей группой в данном случае является аденозин. Интересно, что в случае АМР-ДНК-лигазного комплекса направление *a* затруднено.

Исследование гидролитической устойчивости ковалентных АМР-РНК- и ДНК-лигазных комплексов позволяет предположить, что связь между компонентами в них фосфамидная. Продукты расщепления АМР-РНК-лигазных соединений в водной среде свидетельствуют о том, что механизмы их гидролиза различны и что рядом с нуклеотидом в активном центре фермента находится гидроксильная или карбоксильная группа аминокислот.

Экспериментальная часть

В работе использовали АМР, АДФ, АТФ, дитиотреит, акриламид, бисакриламид, трис (Reanal, Венгрия), [α - 32 P]- и [14 C]АТФ (Изотоп, СССР), биогель Р-30 (50—100 меш; Bio-Rad, США), мембранные фильтры, 0,4 мкм (Chemapol, СССР), β -меркаптоэтанол (Calbiochem, США), фосфодиэстеразу змеиного яда (Worthington, США), Т4-РНК- и ДНК-лигазы (Вильнюсское научно-производственное объединение «Фермент», Главмикробиопром). Другие химические реактивы были отечественного производства. В работе применяли радиоспектрометр LS-100 С (Beckman, США), проточный денситометр Uvicord S (ЛКВ, Швеция), прибор для вакуумной фильтрации (Amicon, США), горизонтальный высоковольтный аппарат для электрофореза на бумаге (Labor, Венгрия), хроматоскоп, спектрофотометр СФ-26, ультратермостат отечественного производства.

Хроматографию проводили на хроматографической бумаге FN-13 (быстрая, Filtrak, ГДР) в системе этанол — 1 М уксуснокислый аммоний (рН 7,5), 7 : 3.

Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтиляторе (4 г РРО, 0,2 г РОРОР на 1 л) и в диоксановом сцинтиляторе (60 г нафталина, 4 г РРО, 0,2 г РОРОР, 200 мл этилового спирта и диоксана до 1 л).

Выделение [32 P]- и [14 C]АМР-РНК-лигазного соединения с помощью гель-фильтрации. Реакционную смесь, содержащую в 0,6 мл 41 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5), 8,3 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 54,8 нМ [α - 32 P]АТФ или [14 C]АТФ и 0,3 мл РНК-лигазы, инкубировали 20 мин при 20° С. Содержимое пробирки наносили на колонку (0,9×56 см) с биогелем Р-30 и элюировали 10 мМ трис-НСl-буфером, рН 7,5, содержащим 1 мМ дитиотреит и 1 мМ EDTA. Собирали фракции по 0,5 мл, скорость элюции 0,15 мл/мин. Поглощение при 206 нм регистрировали проточным денситометром Uvicord S. Из каждой фракции брали по 10 мкл раствора, наливали 0,1 мл воды и 10 мл диоксанового сцинтиллятора и мерили радиоактивность. Аналогично выделяли [14 C]АМР-ДНК-лигазный комплекс.

Исследование гидролитической устойчивости [32 P]АМР-РНК-лигазного соединения. К 5 мкл [32 P]АМР-РНК-лигазного соединения (~8000 имп/мин) прибавляли 100 мкл 0,2 н. HCl, 0,2 н. NaOH, 3,86 М гидроксилламин, рН 4,8, или 0,5 мкл (1,2 мг/мл) фосфодиэстеразы змеиного яда (воду или 0,2 М натрий-ацетатный буфер, рН 4,8, в случае контрольных экспериментов). Реакционные смеси инкубировали 10 мин при 70° С в случае кислоты и щелочи, 25 мин при 37° С в случае гидроксилламина и 1 ч при 37° С в случае фосфодиэстеразы. В реакционные смеси прибавляли 100 мкл холодной 5% трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирок количественно наносили на смоченные водой мембранные фильтры, которые промывали 200 мкл воды. Мембранные фильтры помещали в кюветы, наливали по 10 мл толуольного сцинтиллятора и мерили радиоактивность. Считали, что импульсы, полученные в контрольных экспериментах, отвечают 100% АМР-РНК-лигазного комплекса.

Исследование гидролитической устойчивости [14 C]АМР-РНК-лигазных соединений. К 15 мкл [14 C]АМР-РНК- или ДНК-лигазных соединений

(~3000 имп/мин) прибавляли 15 мкл 0,3 н. HCl или 20 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,5. Реакционные смеси инкубировали 1 ч при 37° С в случае кислоты, 11 сут при 10° С в случае буфера и фракционировали с помощью хроматографии на бумаге. Контрольные образцы (аденозин, АМР, АDP и АТР) позволили идентифицировать продукты расщепления. Хроматограмму высушивали, полосы разрезали (1×1 см), помещали в кюветы, наливали по 10 мл толуольного сцинтиллятора и мерили радиоактивность. Из полученных результатов рассчитывали процент расщепления АМР-РНК-лигазных соединений.

Фракционирование [³²P]АМР-РНК-лигазного комплекса с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях в вертикальных пластинках полиакриламидного геля. Концентрация разделяющего полиакриламидного геля составляла 15%, а концентрирующего геля — 3%. Толщина геля 3 мм. [³²P]АМР-РНК-лигазный комплекс (~15 000 имп/мин) наносили на гель вместе с буферным раствором (~20 мкл) следующего состава: 62,5 мМ трис-HCl (pH 6,8), 2% додецилсульфат натрия, 5% β-меркаптоэтанол, 10% глицерин и 0,001% бромфеноловый синий. Электрофорез проводили в электродном буферном растворе: 25 мМ трис-HCl (pH 3,3), 0,192 М глицин, 0,1% додецилсульфат натрия. После электрофореза белки окрашивали в растворе кумасси синего. [³²P]АМР-РНК-лигазный комплекс идентифицировали методом автордиографии.

Реакцию [¹⁴C]АМР-РНК-лигазных соединений с пирофосфорной кислотой проводили согласно [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельяминова А. Г., Ямковой В. И. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1445–1466.
2. Uhlenbeck O. C., Gumpert R. I. The Enzymes, 3rd edn/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1982, v. 15, p. 31–60.
3. Greer C. L., Javor B., Abelson J. Cell, 1983, v. 33, p. 899–906.
4. Greer C. L., Peebles C. L., Gegenheimer P., Abelson J. Cell, 1983, v. 32, № 2, p. 537–546.
5. Schwartz R. C., Greer C. L., Gegenheimer P., Abelson J. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 13, p. 8374–8388.
6. Filipowicz W., Konarska M., Gross H. J., Shatkin A. J. Nucleic Acids Res., 1983, v. 11, № 5, p. 1405–1422.
7. Gumpert R. I., Lehman I. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 68, № 10, p. 2559–2563.
8. Shabarova Z. A. Progr. Nucleic Acids Res. and Mol. Biol. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. 10, p. 145–182.
9. Юодка В. А. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 2, с. 149–169.
10. Юодка В. А., Маркуцкас А. Я., Спечкунте М. А., Жилинскене В. Ю., Дрыгин Ю. Ф. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1733–1734.
11. Cranston J. W., Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 23, p. 7447–7456.

Поступила в редакцию
10.XI.1984
После доработки
24.XII.1984

HYDROLYTIC STABILITY OF THE COVALENT AMP-RNA LIGASE COMPLEX

JUODKA V. A., MARKUCKAS A. YA.

*Department of Biochemistry and Biophysics, Kapsukas V. Vilnius
State University, Vilnius*

Behaviour of the covalent [³²P]- and [¹⁴C]AMP-RNA ligase complex under various conditions has been studied. The covalent structure is shown to be readily cleaved by acid and hydroxylamine and relatively stable to alkali and snake venom phosphodiesterase. Products of degradation of the AMP-RNA ligase and AMP-DNA ligase complexes were compared. The data obtained support the earlier assumption of a phosphoamide bond in the AMP-RNA ligase compound.