



УДК 577.159.048

ФОТОАФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*  
В ТРАНСКРИПЦИОННОМ КОМПЛЕКСЕ АНАЛОГАМИ СУБСТРАТОВ*Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н.,  
Липкин В. М.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва**Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г.**Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Опубликованные исследования по аффинной модификации РНК-полимеразы [1—6] проводились либо в отсутствие матрицы, либо в присутствии неприродных матриц. Настоящее сообщение посвящено разработке подходов к аффинной модификации РНК-полимеразы в транскрипционном комплексе с природными матрицами.

$\gamma$ -Азидоанилиды АТР и ГТР с успехом используются для фотоаффинной модификации ряда белков [7, 8]. Оказалось, что подобно анилиду АТР [9] эти аналоги являются субстратами ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. РНК, синтезируемые при использовании этих аналогов, несут на 5'-конце остаток *p*-азидоанилина. Это обстоятельство открывает возможность фотоаффинного мечения «коридора» движения продукта в транскрипционном комплексе.

В качестве матриц в настоящем исследовании использованы промотор-содержащие фрагменты: фрагмент длиной 1100 пар оснований из ДНК фага  $\lambda_{2}^{434}$ , содержащий единственный промотор (Р) 4S-РНК [10], и фрагмент длиной около 1000 пар оснований из ДНК фага Т7, содержащий промоторы (А<sub>1</sub>), (А<sub>2</sub>), (А<sub>3</sub>) [11].

$\gamma$ -Азидоанилиды АТР и ГТР синтезировали методом [12]. РНК-полимераза *E. coli* [13] содержала стехиометрическое количество  $\sigma$ -субъединицы и имела активность 1000 ед. акт. [14] на 1 мг. Аффинную модификацию РНК-полимеразы проводили следующим образом: 20 мкл реакционной смеси ( $5 \cdot 10^{-2}$  М NaCl,  $10^{-2}$  М MgCl<sub>2</sub>,  $10^{-2}$  М трис-HCl (рН 7,9),  $10^{-4}$  М дитиотреит, 5% глицерин, 2 мкг фрагмента ДНК, 4 мкг РНК-полимеразы, 4 мкг сыровоточного альбумина,  $2 \cdot 10^{-4}$  М фотореакционноспособный аналог NTP, <sup>32</sup>P-меченый NTP в концентрации  $10^{-5}$  М, если указано, еще один немеченый NTP в концентрации  $10^{-4}$  М) инкубировали без NTP 5 мин при 25°, затем добавляли аналог и NTP, инкубировали 2 мин при 25° и облучали осветителем ОИ-18 с ртутной лампой СВД-120 А через светофильтр БС-4 (пропускание при длинах волн более 290 нм) на расстоянии 10 см в течение 1 мин. Далее смесь прогревали 2 мин при 90° в присутствии 3%-ного додецилсульфата натрия, 5%-ного 2-меркаптоэтанол-

ла, 10%-ного глицерина, 0,06 М трис-НСl (рН 6,8) и подвергали электрофору в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) с 0,1 %-ным додецилсульфатом натрия в градиенте полиакриламидного геля 4—30%. Мокрый гель радиоавтографировали 18 ч и окрашивали белковые полосы кумасси G-250. Некоторые из полученных радиоавтограмм показаны в таблице (см. вклейку). В этих условиях достигается полное превращение азидной группы аналогов. Выход аффинной модификации в моль радиоактивного продукта на моль РНК-полимеразы составляет 2—10%.

Результаты экспериментов можно суммировать следующим образом.

1. При использовании надлежащих комбинаций субстратов имеет место аффинная модификация РНК-полимеразы. Использование немеченого фотореакционноспособного аналога позволило исключить из рассмотрения неспецифическую модификацию избытком фотореакционноспособного субстрата — очевидно, что источником радиоактивности фермента при этом может быть только ковалентно связанный с белком синтезированный в системе олигонуклеотид. Первичные структуры олигонуклеотидов, которые должны синтезироваться при различных сочетаниях субстратов и матриц, приведены в таблице.

2. Модификация имеет место внутри транскрипционного комплекса, поскольку присутствующий в смеси альбумин не модифицируется; РНК-полимераза не модифицируется, если перед облучением транскрипционный комплекс разрушить детергентом.

3. Модификация не происходит при комбинации субстратов, не соответствующих структуре 5'-концевых участков синтезируемых на промоторе РНК.

4. Во всех случаях при использовании нативных фрагментов ДНК модификация происходит по  $\beta\beta'$ - и  $\sigma$ -субъединицам; в случае фрагмента ДНК Т7 некоторые комбинации субстратов обеспечивают также модификацию  $\alpha$ -субъединицы.

5. Денатурация фрагмента ДНК приводит к тому, что  $\sigma$ -субъединица совершенно перестает модифицироваться (опыт 6, таблица).

Делать выводы о топографии транскрипционного комплекса на основании полученных данных было бы преждевременно. Однако хотелось бы обратить внимание на то, что достоверная модификация  $\alpha$ -субъединицы происходит только при одной из использованных комбинаций субстратов, которая должна обеспечивать синтез гексануклеотида на промоторе А<sub>3</sub> фрагмента ДНК фага Т7 (опыт 5, таблица). Модификация  $\alpha$ -субъединицы не наблюдается при таких сочетаниях субстратов, которые должны обеспечивать синтез ди-, три-, тетра- и декануклеотидов на других промоторах. Этому факту можно дать два альтернативных объяснения. Во-первых, возможно, что в ходе элонгации контакт 5'-конца синтезируемой РНК с  $\alpha$ -субъединицей наступает лишь при длине в 6 оснований. Во-вторых, нельзя исключить, что топография транскрипционных комплексов с участием разных промоторов существенно различается, а не является универсальной, как это считает сейчас большинство исследователей.

Авторы выражают признательность акад. Ю. А. Овчинникову, по инициативе которого проводится настоящая работа, за постоянное внимание и ценные советы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Spoor T. C., Persica F., Evans J., Kimball A. P. (1970) *Nature*, 227, 57—59.
2. Nixon J., Spoor T. C., Evans J., Kimball A. P. (1972) *Biochemistry*, 11, 4570—4572.
3. Wu F., Wu C. (1974) *Biochemistry*, 13, 2562—2566.
4. Frischauf A. M., Scheit K. N. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 53, 1227—1233.
5. Armstrong V., Sternbach H., Eckstein F. (1974) *FEBS Lett.*, 44, 157—159.

6. Armstrong V., Sternbach H., Eckstein F. (1976) *Biochemistry*, **15**, 2086—2091.
7. Budker V. G., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A., Teplova N. M. (1974) *FEBS Lett.*, **49**, 159—162.
8. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) *FEBS Lett.*, **85**, 283—286.
9. Grachev M. A., Zaychikov E. F. (1974) *FEBS Lett.*, **49**, 163—166.
10. Свердлов Е. Д., Монастырская Г. М., Ростаншоб В. М. (1978) *Биооргани. химия*, **4**, 894—900.
11. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. (1978) *Докл. АН СССР*, **239**, 475—478.
12. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1975) *Биооргани. химия*, **1**, 611—615.
13. Burgess R. R., Jendrisak J. J. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4634—4638.
14. Burgess R. R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6160—6167.
15. Scherer G., Hobom G., Kössel H. (1977) *Nature*, **265**, 117—121.
16. Pribnow D. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 784—788.
17. Pribnow D. (1975) *J. Mol. Biol.*, **99**, 419—443.
18. Iida Y., Matsukage A. (1974) *Mol. and Gen. Genet.*, **129**, 27—35.

Поступило в редакцию  
1.VI.1978

### PHOTOAFFINITY LABELING OF *E. COLI* RNA POLYMERASE WITH SUBSTRATE ANALOGS IN A TRANSCRIBING COMPLEX

SVERDLOV E. D., TSARYOV S. A., MODYANOV N. N., LIPKIN V. M.

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

GRACHEV M. A., ZAYCHIKOV E. F., PLETNYOV A. G.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry,  
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR*

$\gamma$ -Azidoanilidates of ATP and GTP are substrates of DNA-dependent RNA polymerase of *E. coli*. The RNA product synthesized in the presence of these analogs contains azidoaniline residue at the 5'-end, therefore which allows to label the «corridor» along which RNA leaves the transcribing complex. The photoaffinity labeling experiments were performed in the presence of two kinds of promoter-containing fragments — a 1000 base pairs-long fragment of  $\lambda_i^{434}$  DNA containing a single promoter of 4S RNA, and fragment of the same length of T7 DNA containing the early promoters  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ . The reaction mixtures composed of a promoter-containing fragment, RNA polymerase, one of the analogs, a radioactive NTP, and, in some cases, additional nonradioactive NTP, were irradiated by UV-light ( $\lambda > 290$  nm). With different substrate and template combinations various labeling patterns were obtained involving  $\beta\beta'$ -,  $\sigma$ -,  $\alpha$ -subunits.

Результаты радиоавтографии гель-электрофореграмм (R — остаток *h*-азидоанилина;  
\* — положение меченого  $^{32}\text{P}$ )

Номер опыта	Фрагмент ДНК фага	Комбинация субстратов (промотор)	Предполагаемая структура олигонуклеотида (15, 16, 17, 18)	Радиоавтография <sup>1*</sup>			
				$\beta\beta'$	$\sigma$	альбумин	$\alpha$
1	$\lambda_{2}^{434}$	RpppG pppU <sup>*</sup> (P)	RpppG <sup>*</sup> pU <sup>*</sup> pG				
2	$\lambda_{2}^{434}$	RpppG pppU <sup>*</sup> pppA (P)	RpppG <sup>*</sup> pU <sup>*</sup> pGpA <sup>*</sup> pGpA <sup>*</sup> pU				
3	T7	RpppG pppC <sup>*</sup> (A <sub>2</sub> )	RpppG <sup>*</sup> pC				
4	T7	RpppA pppU <sup>*</sup> pppC (A <sub>1</sub> )	RpppA <sup>*</sup> pU <sup>*</sup> pC				
5	T7	RpppA pppU pppG <sup>*</sup> (A <sub>3</sub> )	RpppA <sup>*</sup> pU <sup>*</sup> pGpA <sup>*</sup> pA				
6	$\lambda_{2}^{434} 2^*$	RpppG pppU <sup>*</sup>					
7	T7	pppA pppU pppG <sup>*</sup> (A <sub>3</sub> )	pppA <sup>*</sup> pU <sup>*</sup> pGpA <sup>*</sup> pA				

Примечания к таблице: <sup>1\*</sup> Указано положение  $\beta\beta'$ -,  $\sigma$ -,  $\alpha$ -субъединиц РНК-полимеразы и альбумина в использованных условиях гель-электрофореза. <sup>2\*</sup> Фрагмент денатурирован 10 мин при 100°. <sup>3\*</sup> Аналогичный результат получен в условиях опытов 1—4, 6, если вместо RpppN использовали pppN.