

Методы ковалентного присоединения нуклеиновых кислот и их производных к белкам

Г.Я.Шефлян, Е.А.Кубарева, Е.С.Громова

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского при Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет 119899 Москва, Воробьевы горы, факс (095) 939–3181

Рассмотрены методы аффинной модификации белков, специфичных к нуклеиновым кислотам, активированными аналогами нуклеиновых кислот и их компонентов. Перечисляются активные группы, вводимые в белки или нуклеиновые кислоты, и симметричные «сшивающие» агенты, используемые для получения ковалентных белково-нуклеиновых комплексов. Обобщены методы анализа ковалентно-связанных белково-нуклеиновых аддуктов, а также способы идентификации аминокислот в белке, участвующих в образовании связи с нуклеиновыми кислотами.

Библиография — 112 ссылок.

Оглавление

I. Введение	765
II. Ковалентное присоединение белков к нуклеиновым кислотам под действием различных типов облучения	766
III. Химические методы ковалентного присоединения белков к нуклеиновым кислотам	771
IV. Ковалентное присоединение нуклеиновых кислот к ферментам, основанное на использовании механизма функционирования последних	773
V. Методы идентификации и выделения ковалентных ДНК-белковых комплексов	775
VI. Определение пептидов в белке, ковалентно связанном с нуклеиновой кислотой	776
VII. Применение метода ковалентного присоединения ДНК-специфичных белков к нуклеиновым кислотам для зондирования механизмов их взаимодействия	779
VIII. Заключение	779

I. Введение

Существует сравнительно небольшое число методов, позволяющих определять группы в белке, участвующие в белково-нуклеиновом узнавании. Самый точный из них — рентгеноструктурный анализ (РСА). Однако из-за плохого разрешения рентгенограмм, трудностей выделения достаточных количеств белка, а также из-за различий в конформации макромолекул в растворе и кристалле этот метод не нашел широкого применения. Кроме того, не всегда удается получить и выделить специфические комплексы белков с ДНК, существуют и проблемы, связанные с их кристаллизацией.

Сайт-специфический мутагенез и химическая модификация белка также дают ценную информацию о взаимодействии белков с нуклеиновыми кислотами, но для проведения подобных экспериментов необходимо хотя бы в первом приближении локализовать участок в белке, отвечающий за этот процесс. Методом, позволяющим определять этот участок, является ковалентное присоединение белков к нуклеиновым кислотам (НК).

В настоящее время известно большое число способов присоединения белков к НК. Мы попытались систематизировать имеющиеся в литературе данные по этому вопросу. На наш взгляд, существующие способы аффинной модификации белков НК можно разделить на три группы:

— ковалентное присоединение белков к НК под действием различных типов облучения;

— химические методы ковалентного присоединения белков к НК;

— ковалентное присоединение НК к ферментам, основанное на механизме их функционирования.

Для аффинной модификации белка чаще всего используют аналоги НК, содержащие различные активные группировки. Такие группировки могут быть введены в гетероциклические основания и углеводные остатки, по концевой или межнуклеотидной фосфатной группе НК. В связи с этим мы сочли необходимым уделить внимание и способам активации НК, используемым в каждом из методов ковалентного присоединения белков к НК.

Г.Я.Шефлян. Кандидат химических наук, научный сотрудник НИИ ФХБ. Телефон 939–5420

Е.А.Кубарева. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии нуклеиновых кислот НИИ ФХБ. Телефон 939–3148

Е.С.Громова. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон 939–3144

Область научных интересов авторов: механизм узнавания нуклеиновых кислот белками, использование синтетических олигонуклеотидов для изучения ДНК-белковых взаимодействий.

Дата поступления 13 декабря 1995

В заключительных главах обзора обобщены подходы к идентификации и выделению ковалентных НК-белковых комплексов, определению пептидов в белке, ковалентно связанных с НК. Рассматриваются возможности применения метода ковалентного присоединения НК-специфичных белков к НК для зондирования механизмов их взаимодействия.

II. Ковалентное присоединение белков к нуклеиновым кислотам под действием различных типов облучения

1. Облучение УФ-светом

При облучении комплексов белков с НК или их аналогами УФ-светом происходит ковалентное присоединение боковых цепей белка к максимально приближенным к ним остаткам гетероциклических оснований (так называемая «сшивка нулевой длины»).

а. Облучение УФ-светом комплексов белков с немодифицированными НК

Этот метод ковалентного присоединения применяется в отношении широкого диапазона биологических систем: от клеточных ядер до выделенных и очищенных белков в комплексе с синтетическими олигонуклеотидами. Условия облучения различных систем с целью получения белково-нуклеиновых комплексов в соответствующих буферных растворах обобщены в табл. 1. Из приведенных данных видно, что время облучения изменяется в пределах от 1 мин до 4 ч, длина волны, как правило, составляет 254 нм. В этих условиях выход конъюгата варьирует от 0.1 до 70%. В некоторых случаях из-за сложности системы не было возможности определить выход конечного конъюгата, поэтому вместо этого приводится стехиометрия комплекса, отражающая

количество молекул белка на одну молекулу ДНК или количество пар оснований ДНК, ковалентно связанных с одной молекулой белка.

При облучении УФ-светом белково-нуклеинового комплекса возбуждается 5,6-двойная связь пиримидинов, что приводит к ее разрушению; образуется бирадикал по положениям 5 и 6 пиримидинового цикла, который реагирует с боковыми цепями белка.²¹ Такой механизм реакции был установлен при детальном рассмотрении продуктов облучения урацила в присутствии цистеина (схема 1).

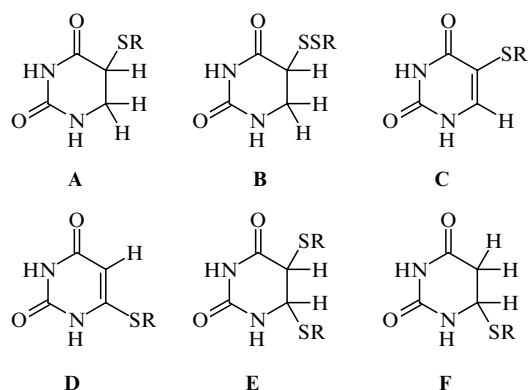
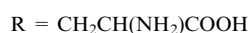


Схема 1



Соединения **A**, **B**, **E** и **F** образуются при облучении светом с длиной волны > 290 нм в присутствии ацетофенона, который является «ловушкой» для радикалов. Предполагают, что реакция обратима. Продукт **C** образуется в растворах, содержащих генераторы свободных радикалов, например, кислород или рибофлавин. Условия облучения зависят от энергии, необходимой для образования радикала: при наличии в растворе кислорода используется длина волны 254 нм,

Таблица 1. Условия облучения комплексов белков с немодифицированными НК и выходы продуктов реакции.

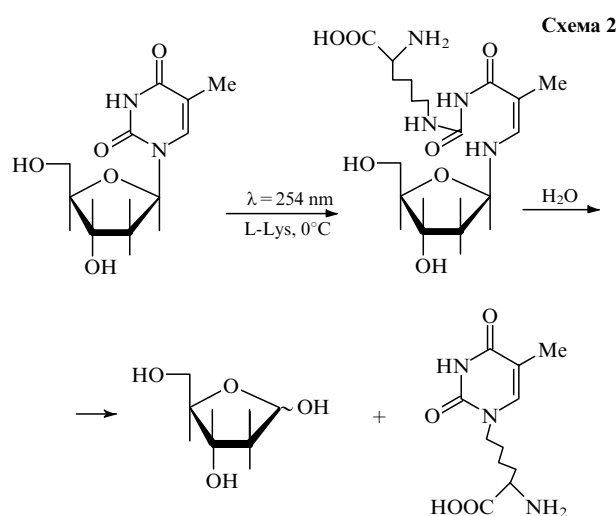
Объект	Длина волны, нм	Время, мин	Выход (%) или стехиометрия комплекса	Ссылки
Ядро эритроцита цыпленка	254	240	58 ^a , 70 ^c	1
Нуклеогистон	230–290	30	см. ^b	2
Нуклеосома тимуса телят	> 250	40	см. ^b	3
Клетки культуры ткани <i>D. melanogaster</i>	не указана	12	см. ^b	4
Клетки <i>Trypanosoma brucei</i>	254	10	см. ^b	5
РНК-Полимераза и ДНК <i>E. coli</i>	254	1–4	0.1	6
РНК-Полимераза <i>E. coli</i> и ДНК фага T7	254	20–240	см. ^b	7
РНК-Полимераза <i>E. coli</i> и поли-d(AT)	254	не указано	50 (белок : НК = 3 : 1, 6 : 1 и 12 : 1)	8
σ-Фактор РНК-полимеразы <i>E. coli</i> и одноцепочечная ДНК фага M13 с олигонуклеотидным праймером	254	20	25 ^c	9
Белок snRNP и РНК	254	30	см. ^b	10
ДНК-Полимераза и фрагменты ДНК фага T7	254	не указано	белок : НК = от 3 : 1 до 10 : 1	11
Πе-тРНК-Синтетаза и АТФ	253.7	30–40	белок : АТФ = 6.7 : 1	12
Белок репликации А и одноцепочечная ДНК	УФ-область	10	см. ^b	13
ДНК-связывающий белок аденовируса и p(dT) ₁₄	УФ-область	20	20 ^a	14
Белок человека, узнающий d(GA) _n - и d(GT) _n -повторы в ДНК, и d(GA) _n	254	100	см. ^b	15
Гуанидинацетатметилтрансфераза и SAM ^d	254	240	17–20 ^a	16
ДНК-метилтрансфераза CheR из <i>Salmonella typhimurium</i> и SAM	254	40	60–70 ^c	17
ДНК-метилтрансфераза Dam из <i>E. coli</i> и SAM	254	5–90	3–4 ^c	18, 19
ДНК-метилтрансфераза MspI и SAM	254	60	см. ^b	20

^a Выход указан в расчете на белок; ^b выход не указан; ^c выход указан в расчете на ДНК; ^d S-аденозил-L-метионин; ^e выход указан в расчете на SAM.

а при наличии рибофлавина — 290 нм. Вероятно, соединение **C** получается из **E**, как из первичного продукта. Соединение **D** образуется, по-видимому, аналогично **C** через свободный радикал в положении 5 урацила.²²

К настоящему времени в литературе нет единого мнения о механизме ковалентной «сшивки» немодифицированных НК с белками под действием УФ-света. В ряде работ, например в работе²¹, высказывается предположение о том, что такая «сшивка» является неспецифической и зависит не от природы боковой цепи аминокислотного остатка, а от расстояния между ней и гетероциклом. Другие авторы (см. работы^{3, 22, 23}), напротив, отмечают специфичность образующейся ковалентной «сшивки» по отношению к остаткам определенных аминокислот, например, Ser, Ile, Thr, Arg, Lys.

Сайто и соавт.³ считают, что при УФ-облучении комплексов белков с НК происходит «сшивка» между остатком тимина и ϵ -аминогруппой лизина. Для изучения этой реакции была использована модельная система дезокситимидин–L-Lys (схема 2).



Установлено, что при облучении светом с длиной волны > 280 нм аддукт L-Lys—тимидин не образуется. Под действием УФ-света тимидин также взаимодействует с Arg. Реакция идет по α -аминогруппе Arg, а не по гуанидиновому остатку, т.е. Arg в составе белка может реагировать с тимидином при облучении только в том случае, если он является N-концевым.

Рассмотренный в данном разделе метод УФ-облучения белков и НК имеет свои достоинства и недостатки. К достоинствам относится возможность идентификации аминокислотного остатка, максимально сближенного с НК. Однако отсутствие ковалентного аддукта после облучения не говорит об отсутствии контакта между НК и белком, так как, возможно, что активация компонентов комплекса УФ-облучением недостаточна для протекания реакции. Недостатком метода является также нарушение структуры НК и белка при высокой интенсивности и длительности облучения. При этом мутации, имеющие место в НК, мешают исследованию конъюгата (например, из-за изменения подвижности в геле), а инактивация белка, которая может происходить либо из-за его разрушения при облучении, либо благодаря ковалентной «пришивке», не может служить тестом на образование белково-нуклеинового комплекса.

б. Облучение УФ-светом комплексов белков с модифицированными аналогами НК

«Сшивку» белков с фоточувствительными аналогами НК используют для определения топологии комплексов НК–белок. В качестве таких аналогов применяют НК, в

положение 5 пиримидиновых и в положение 8 пуриновых оснований которых введены атом брома или азидогруппа.²⁴ Указанные химические группы экспонированы в большую бороздку двойной спирали. Они не вызывают существенных изменений в ее структуре и не препятствуют белково-нуклеиновому узнаванию.

Условия «пришивки» бром- и азидозамещенных аналогов НК к белкам обобщены в табл. 2. Как видно из таблицы, условия облучения для модифицированных аналогов НК мягче, чем для немодифицированных НК. Выходы ковалентно связанных белково-нуклеиновых конъюгатов довольно велики и в некоторых системах составляют 60%.

Введение фоточувствительных групп в гетероциклическое основание изменяет механизм реакции. Облучение комплексов бромзамещенных аналогов НК с белком сопровождается потерей атома брома и образованием неспаренного электрона в положении 5 остатка урацила, который может реагировать различными способами с боковыми цепями белка, давая ковалентную «сшивку».²¹ Единственным условием такой «сшивки» является близкое расположение боковой цепи аминокислотного остатка и свободного радикала. Вольфс и соавт.²⁵ считают наиболее вероятным взаимодействие бромсодержащих субстратов с остатками Gly, Ser, Phe, Tug, Trp, Cys, Met, имеющими алифатические цепи или ароматические циклы, как с возможными акцепторами свободных радикалов. Более подробно механизм и специфичность этой реакции не изучали. Среди достоинств рассматриваемого метода следует отметить большую чувствительность модифицированных НК к УФ-облучению, вследствие чего снижается вероятность мутаций в НК и белке из-за меньшей интенсивности и времени облучения.

Азидозамещенные аналоги НК еще более эффективны в реакции ковалентного связывания.⁴⁰ В случае остатков нуклеозидов, содержащих азидогруппу в положении 8 пуриновых или в положении 5 пиримидиновых оснований, механизм образования ковалентно связанного белково-нуклеинового комплекса значительно сложнее. При облучении УФ-светом в результате фотохимического отщепления атома азота образуется не радикал, а нитрен, который может неселективно реагировать с ближайшими группами, независимо от их электрофильности или нуклеофильности.³⁷ Косвенное доказательство этого механизма было получено при спектрофотометрическом исследовании последствий облучения УФ-светом N_3^5dUTP .⁴⁰ Уже через 20 с происходит полное исчезновение максимума при 288 нм, отвечающего азидопроизводному dUTP. Снижение поглощения после фотоллиза свидетельствует о разрушении сопряженной кольцевой системы гетероциклического основания (возможно, из-за внутримолекулярной перегруппировки, инициированной образованием нитрена).

Особая ценность азидопроизводных НК состоит в том, что азидогруппа достаточно мала и не препятствует образованию водородных связей между белком и НК. Кроме того, введение азидогруппы в положение 5 пиримидиновых остатков не меняет *anti*-конформацию гетероциклического основания в нуклеозиде, а вызывает лишь небольшое искажение структуры нуклеиновой кислоты.^{40, 41} Рейх и Эверет⁴¹ проводили сравнение кинетических параметров взаимодействия метилтрансферазы EcoRI с кофактором SAM (*S*-аденозил-L-метионином), а также его аналогом, содержащим азидогруппу в положении 8 гетероциклического основания. Оказалось, что константы связывания с ферментом в отсутствие ДНК для нативного кофактора и его азидоаналога имеют один и тот же порядок и равны 4.8 и 12.9 нМ соответственно. Каталитическая константа (k_{cat}) и константа Михаэлиса–Ментен (K_M) для SAM и 8-азидо-SAM в составе тройных комплексов с ферментом и с 12-звенным ДНК-дуплексом практически не отличаются и равны для нативного кофактора 4.3 с^{-1} и 0.335 нМ , а для модифицированного соединения 5.0 с^{-1} и 0.710 нМ соответственно. Эти

Таблица 2. Условия облучения комплексов белков с модифицированными аналогами НК и выходы продуктов реакции.

Объект	Длина волны, нм	Время, мин	Выход комплекса, %	Ссылки
Эндонуклеазы рестрикции <i>EcoRI</i> и <i>EcoRV</i> и ДНК-дуплекс, содержащий br^5dU	> 300	1	0.05 ^a	25
<i>lac</i> -Репрессор и олигонуклеотид с <i>lac</i> -операторной последовательностью, содержащий br^5dU	300–400	20	60 ^b	26, 27
Связывающий матрицу полипептид в транскрипционном комплексе хлоропластов гороха и ДНК, содержащая br^5dU	300–315	20	не указан	28
Белок оболочки бактериофага R17 и РНК, содержащая br^5U	312	3	20 ^a	29
Активатор транскрипции GCN4 дрожжей и ДНК, содержащая br^5dU	254	1.5	2	30
Рецепторный белок циклического 3',5'-фосфата и ДНК <i>E. coli</i> , содержащая br^5dU	300–400	не указано	70 ^b	31
Хромосомный белок археобактерий MC1 и ДНК <i>E. coli</i> , содержащая br^5dU	300–400	не указано	20 ^b	32
ДНК-Метилтрансфераза <i>EcoRV</i> и ДНК, содержащая 4-тиотимидин	> 310	10–12	18–35 ^a	33
ДНК-Метилтрансфераза <i>EcoRV</i> и ДНК, содержащая 6-тиодезоксигуанозин	> 310	10–12	5–8 ^a	33
Эндонуклеаза рестрикции <i>EcoRV</i> и ДНК, содержащая 4-тиотимидин	> 310	10–12	6 ^a	33
Эндонуклеаза рестрикции <i>EcoRV</i> и ДНК, содержащая 6-тиодезоксигуанозин	> 310	10–12	6 ^a	33
Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза и 40-звенная ДНК, содержащая N_3^5dU	302	1	40–50 ^a	34
ДНК-полимераза I и олигонуклеотидный дуплекс, содержащий N_3^5dU	302	2	40 ^b	35
Карбокси-О-метилтрансфераза и 8-азидо-SAM	254	15	42 ^b	36
РНК-полимераза <i>E. coli</i> и N_3^8dA	254	8	не указан	37
70S рибосомы и тРНК ^{Phe} <i>E. coli</i> , содержащая 3-{ <i>N</i> -[<i>N</i> -(<i>n</i> -азидобензоил)глицил]-(3-амино-3-карбоксипропил)}уридин	УФ-область	2–3	25	38
Эндонуклеаза V фага T4 и 14-звенный ДНК-дуплекс, содержащий 4-(1-ази-2,2,2-трифторэтил)бензоат	365	30	15 ^a	39

^a Выход указан в расчете на НК; ^b выход указан в расчете на белок.

результаты свидетельствуют о несущественном характере изменений в структуре нуклеозида при введении азидогруппы. Под действием УФ-света 8-азидо-SAM ковалентно присоединяется к ферменту. Специфичность ковалентного присоединения доказана ингибированием «пришивки» при добавлении немодифицированного кофактора.⁴¹

Другим преимуществом азидопроизводных является то, что превращение азидогруппы в нитрен происходит при значительно более низкой интенсивности УФ-света, что позволяет избежать повреждения ДНК при облучении. В работе⁴⁰ сравнивали начальные скорости разрушения гетероцикла при облучении УФ-светом с длиной волны 254 нм. Установлено, что уменьшение поглощения в максимуме для N_3^5dUMP происходило в 7000 раз быстрее, чем для dTTP и в 1150 раз быстрее, чем для br^5dUMP . Таким образом, азидоаналоги обладают значительно большей реакционной способностью по отношению к белкам. Данные о специфичности их действия отсутствуют.

В качестве фоточувствительных аналогов нуклеозидов были опробованы гетероциклические основания (тимидин и дезоксигуанозин), в которых кетогруппа была заменена на тиогруппу.³³ Установлено, что модифицированные таким образом ДНК-дуплексы ковалентно присоединяются к ферментам рестрикции – модификации *EcoRI* и *EcoRV* (условия их облучения представлены в табл. 2). В контрольных экспериментах показано, что сами ферменты после облучения полностью сохраняют свою активность; облучение фермен-

тов с немодифицированной ДНК не приводит к образованию ковалентно-связанных аддуктов; инкубирование компонентов комплекса без облучения также не вызывает образования конъюгатов.

Вводя остатки 4-тиотимидина в гены, кодирующие 5S рРНК и тРНК^{Tyr} дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, изучали взаимодействие таких ДНК с факторами транскрипции — ТFIIC и ТFIIB. Было показано, что модификация не препятствует образованию нековалентных специфических комплексов с рассматриваемыми белками. Фотоприсоединение происходило после преинкубации комплексов при облучении УФ-светом с длиной волны 300 нм в течение 15 мин. Метод позволил идентифицировать субъединицы факторов транскрипции, контактирующие с определенными участками транскрибируемой ДНК.⁴²

Модификацию мРНК и некоторых рибосомных РНК остатком 4-тиоуридина использовали для изучения топографии рибосом на разных стадиях транскрипции.^{43–48} Было показано, что при транскрипции с участием T7-полимеразы 4-тиоуридинтрифосфат встраивается в синтезируемую цепь РНК так же, как и немодифицированные нуклеозидтрифосфаты.^{43–48} При облучении рибосом, содержащих модифицированные компоненты, УФ-светом с длиной волны > 300 нм в течение 10 мин, образовывались сшивки между мРНК и рибосомными РНК^{43–47} и сшивки РНК – белок. В работе⁴⁸ были идентифицированы рибосомные белки, ковалентно связанные с синтетическим аналогом мРНК, содер-

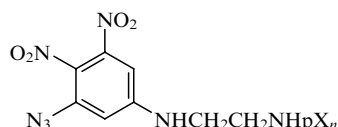
жащим остаток 4-тиоуридина. Метод использовали для определения белков, пространственно близких с мРНК на разных стадиях транскрипции.

Рассмотрим два возможных механизма реакции белков с НК, содержащими 4-тиопиримидиновое основание: в присутствии кислорода и в его отсутствие.³³ В последнем случае происходит присоединение белка к атому С(6) пиримидинового цикла с одновременным восстановлением 5,6-двойной связи. Реакция протекает по радикальному механизму, который включает отщепление атома водорода в возбужденном состоянии от 4-тиопиримидина.

В присутствии кислорода 4-тиопиримидины в составе НК окисляются до соответствующих 4-сульфонатов, которые являются высокореакционноспособными реагентами и подвергаются нуклеофильной атаке со стороны аминокислотных остатков белка с замещением сульфатной группы.

Имеются сведения о механизме фотоприсоединения НК, в состав которых входит 6-тиодезоксигуанозин, к белкам. Считается, что они образуют сульфатные производные в результате облучения.³³

Другой тип активации НК — создание олигорибонуклеотидов или олигодезоксирибонуклеотидов, в которых фотоактивируемая группа не присоединена непосредственно к гетероциклическому основанию. Так, в работе⁴⁹ для аффинной модификации рибосомных белков использовались олигорибонуклеотиды, содержащие динитрофенильный цикл с азидогруппой, связанный с 5'-фосфатной группой через этилендиамин.



X — остаток рибонуклеозида

Митчел и соавт.³⁸ модифицировали тРНК *N*-(*n*-азидобензоил)глицином, присоединяя его к остатку 3-(3-амино-3-карбоксыпропил)уридина (условия облучения представлены в табл. 2). Механизм реакции присоединения модифицированных таким образом НК к белкам не отличается от рассмотренного выше, так как и в этом случае основной фотоактивируемой реакционноспособной группой является азидогруппа.

Кроме нитрена для ковалентного присоединения к белкам можно использовать карбен, образование которого из азипроизводного НК индуцируется при облучении УФ-светом.³⁹ Активная группа — 4-(1-ази-2,2,2-трифторэтил)бензоат — была присоединена к межнуклеотидному фосфату в ДНК-дуплексе. Эта группа в результате облучения УФ-светом с большой длиной волны (см. табл. 2) распадается, давая карбен. Предполагается, что карбены более реакционноспособны, чем нитрены, и, кроме того, облучение УФ-светом с большей длиной волны предпочтительно, так как предотвращает деградацию белка.

в. Использование лазерного излучения

В качестве источника УФ-света может использоваться не только ртутная или минеральная лампа, но и лазер. Отличие лазерного облучения от обычного состоит в чрезвычайной мощности и кратковременности светового импульса. Лазерное излучение впервые было использовано для ковалентного присоединения белков к НК на примере комплекса РНК-полимеразы *E. coli* и ДНК фага Т7. Реакционную смесь облучали единичным импульсом с энергией 120 мДж (время облучения 20 нс, длина волны 248 нм). В зависимости от концентрации меркаптоэтанола выход комплекса изменялся от 5 до 20%.

Механизм ковалентного присоединения белков к НК под действием лазерного облучения не отличается от происходящего при облучении ртутной или минеральной лампы. Однако использование кратковременного импульса и присутствие меркаптоэтанола в качестве «ловушки» долгоживущих радикалов, образующихся при облучении, позволило более подробно охарактеризовать промежуточные соединения, формирующиеся при облучении лазером. Время жизни радикалов, образующихся при облучении, рассчитывается по формуле

$$\frac{f_0}{f_q} = 1 + K_q t,$$

где f_0 и f_q — выходы продукта ковалентного присоединения в отсутствие и в присутствии меркаптоэтанола соответственно, K_q — константа скорости захвата радикалов, t — время жизни радикала.⁵⁰ Установлено, что t составляет 25–4000 нс, причем приблизительно половина радикалов является долгоживущими. Так как время жизни определенной конформации комплекса ДНК с белком оказалось больше длительности импульса лазера, то появилась возможность «заморозить» определенную структуру исследуемого объекта, однако этому мешают долгоживущие радикалы, поскольку они могут реагировать с белком уже после перехода системы в другое состояние (так называемая диффузия радикалов). Для избежания подобных артефактов в качестве «ловушки» долгоживущих радикалов предложено использовать меркаптоэтанол.

Выход продукта ковалентного присоединения белка к НК под действием лазерного облучения линейно зависит от дозы облучения, что говорит о том, что в каждом акте «пришивки» участвует лишь один фотон и для реакции достаточно возбуждения лишь одного из компонентов комплекса. Достоинством метода является меньшее повреждение ДНК по сравнению с другими методами, при этом белок полностью сохраняет нативное состояние.⁵⁰

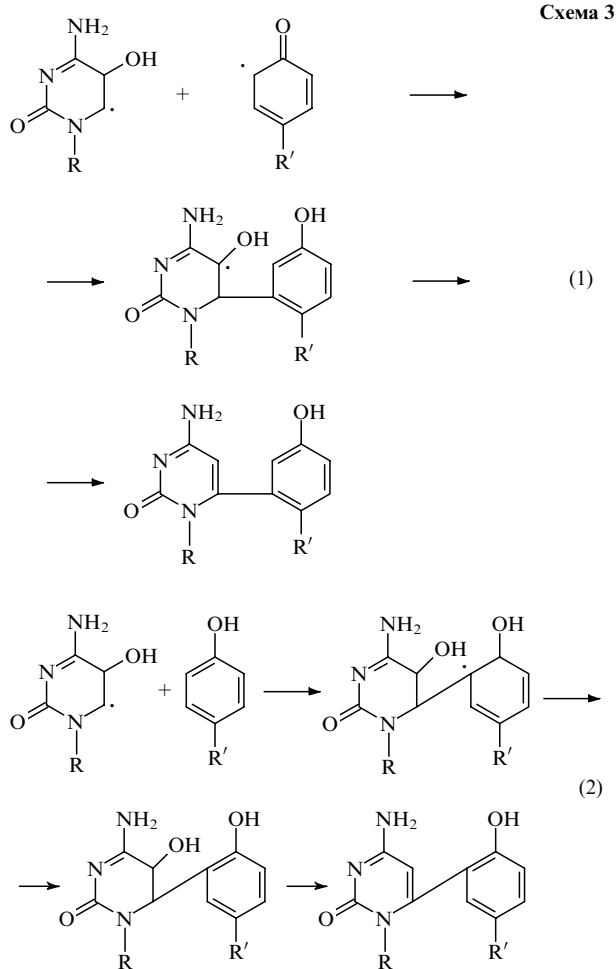
Под действием лазерного облучения ДНК, модифицированной остатком фуранозида псоралена, также могут присоединяться к белкам, что было продемонстрировано на примере их присоединения к РНК-полимеразе бактериофага Т7.⁵¹ Облучение проводили с помощью аргонового лазера с широким спектром излучения и максимумом при 366 нм. При эквимолярном соотношении ДНК и белка в реакционной смеси приблизительно 80% ДНК ковалентно присоединяется к РНК-полимеразе. Методом электрофореза было обнаружено образование нескольких изомерных ковалентных белково-нуклеиновых комплексов. Деградации РНК-полимеразы в этих условиях не обнаружено. Увеличение интенсивности облучения приводило к линейному росту выхода ковалентных аддуктов. Достоинствами этого метода являются короткое время облучения и возможность «замораживания» равновесных состояний комплекса ДНК с белком, что позволяет изучать кинетические константы этого процесса. Предложены два механизма присоединения ДНК, модифицированной фуранозидом псоралена, к белку: 1) через образование синглетного атома кислорода, радикалов или ион-радикалов; 2) прямое фотоприсоединение. Следует отметить, что доказательств в пользу какого-либо из этих путей фотоактивации не найдено, однако выход ковалентного присоединения находится в прямой связи с влиянием внешних условий на стабильность белково-нуклеинового комплекса.⁵¹

2. Облучение γ -источниками

Для получения ДНК-белковых конъюгатов использовали также облучение γ -источниками, для чего соответствующие комплексы, помещали в насыщенный раствор геммоксида азота.^{52,53} Объектом для таких исследований стала нуклеосома. Нуклеосома представляет собой повторяющуюся еди-

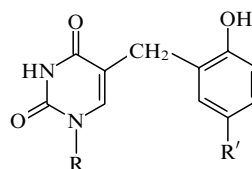
ницу хроматина и включает в себя ДНК, состоящую из 200 нуклеотидных пар, и гистоны H2A, H2B, H3 и H4.⁵⁴ Изучение этой системы важно для понимания механизмов хранения генетической информации.

Под действием γ -облучения происходит ковалентное присоединение гистонов к ДНК. Предполагают образование ковалентной связи между пиримидиновыми остатками ДНК и тирозиновыми остатками белка.⁵³ Для моделирования образования конъюгата ДНК–гистон использовали систему тирозин–цитидин в водном растворе гемиоксида азота.⁵² Механизм реакции заключается в следующем. Облучение раствора вызывает образование нескольких типов радикалов. Гидроксильные радикалы реагируют с цитозином и тирозином, присоединяясь в первом случае к атому углерода C(5), а во втором — к ароматическому циклу с образованием дигидроциклогексаденильных радикалов. Два возможных пути продолжения реакции представлены на схеме 3.



R — остаток рибозы, R' = CH₂CH(NH₂)COOH.

В работе Диздароглу и соавт.⁵³ рассматривалась возможность взаимодействия тирозина с тимидином при γ -облучении. В целом, механизм этой реакции аналогичен рассмотренному выше для цитидина, но образование радикалов происходит в результате отрыва атома водорода от метильной группы тимидина, а не по положению 6 гетероцикла (как для цитидина).



R — остаток рибозы, R' = CH₂CH(NH₂)COOH.

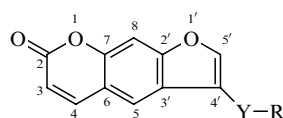
Присутствие молекул кислорода уменьшает вероятность образования ковалентного белково-нуклеинового комплекса, так как кислород образует с пиримидиновыми остатками пероксильные радикалы.

Арундел и соавт.⁵⁵ полагают, что по этой схеме осуществляется ковалентная «пришивка» ДНК к белкам из клеток НСА-1 после обработки их *N*-метилформамидом и γ -облучения. *N*-Метилформамид, по-видимому, не участвует в образовании сшивки непосредственно, а лишь действует как «ловушка» радикалов для повышения радиочувствительности клеток.

Облучение γ -источниками обеспечивает специфическое взаимодействие ДНК с близко расположенными остатками ароматических аминокислот. Однако серьезным препятствием для его широкого применения является необходимость использования насыщенного раствора гемиоксида азота, не способствующего образованию НК-белковых комплексов. Кроме того, жесткое γ -излучение вызывает мутации.

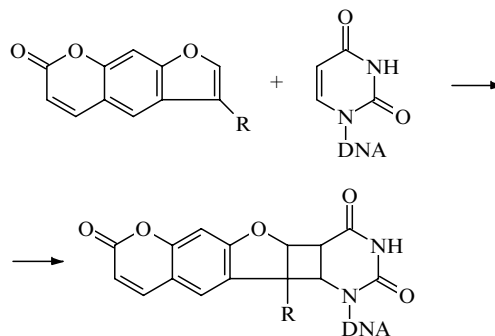
3. Модификация белка

Наиболее часто используется модификация боковых цепей белка псораленом через соответствующую «ножку» (Y).



Y = -NH(CH₂)₂S-, -NMe(CH₂)₂NMe-,
-NMe(CH₂)₂O(CH₂)₂NMeC(O)(CH₂)₂S-;
R — белок

При формировании белково-нуклеинового комплекса псорален интеркалирует в двойную спираль. Если такой комплекс облучать УФ-светом, то образуются моноаддукты с внутренней сшивкой между фурукумарином и пиримидиновым остатком. В присоединении участвуют 3,4- или 4',5'-двойные связи фурукумарина и 5,6-двойная связь пиримидинового остатка. При этом образуются четырехчленные циклы (схема 4).^{21,56}



R — белок

Изменяя длину ножки, соединяющей псорален с белком, можно «пришивать» его как на малом, так и на большом расстоянии от места взаимодействия белка и НК. Недостаток метода состоит в том, что надо заранее знать, какое место в белке следует модифицировать.

III. Химические методы ковалентного присоединения белков к нуклеиновым кислотам

Для ковалентного присоединения белков к НК посредством химической реакции, не связанной с генерированием радикалов при помощи облучения, необходимо либо повысить реакционную способность одного из компонентов белково-нуклеинового комплекса, либо ввести в систему симметричный «сшивающий» агент, способный образовывать ковалентную связь с обоими компонентами комплекса. В качестве такого агента чаще всего используются альдегиды.

1. Использование симметричных «сшивающих» агентов

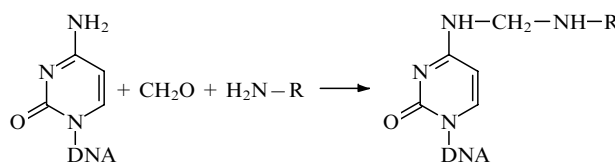
Формальдегид чаще других химических агентов используют для ковалентного присоединения ДНК к белку. Таким путем осуществляли «сшивку» ДНК и гистонов в нуклеосоме ядра тимуса теленка. Целью работы являлась идентификация мест контакта ДНК и белков или фиксация белково-нуклеиновых комплексов, чтобы в процессе дальнейшего изучения не происходило их разделение при центрифугировании и прочих жестких обработках.^{57, 58}

Другим примером применения этого метода является зондирование структуры РНК-полимеразы *E. coli* и ее комплекса с lacUV5-промотором.⁵⁹

Для определения контактов между мРНК или ДНК рBR322 и белками также применяли формальдегид. В данном случае ковалентное присоединение осуществляли в течение 3 ч при 37°C при обработке 0.75%-ным раствором формальдегида экспоненциально растущих клеток *E. coli*.⁶⁰

Формальдегид реагирует с ε-аминогруппой Lys, давая метилольное производное, которое в свою очередь реагирует с амини- и иминогруппами ДНК.^{21, 57} Формальдегид взаимодействует также с остатками аденина и цитозина ДНК по экзоциклическим аминогруппам, причем протоны, участвующие в образовании уотсон-криковских пар, не затрагиваются (схема 5).⁶¹

Схема 5



R — белок

Эндоциклическая иминогруппа цитозина также реагирует с формальдегидом. Кроме того, формальдегид присоединяется к эндоциклическим иминогруппам остатков тимина и урацила.⁶² Таким образом, реакция ковалентного присоединения белков к НК под действием формальдегида специфична по отношению к остаткам лизина в белке, но неспецифична по отношению к гетероциклическим основаниям в НК. Достоинством метода является возможность ковалентного присоединения белка к ДНК без нарушения структуры двойной спирали последней, при этом в реакцию вступают группы атомов, расположенные как в большой, так и в малой бороздке ДНК. Однако рассматриваемый метод приводит к большому количеству сшивок белка с белком, что

усложняет анализ результатов ковалентного присоединения в сложных системах, например в клетках *E. coli*.⁶⁰ Кроме формальдегида в качестве «сшивающих» агентов можно использовать кетоны, например ацетофенон и бензофенон.

В качестве симметричных «сшивающих» агентов применяют также глутаровый альдегид и 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид. Первый реагирует с первичными аминогруппами как белка, так и НК с образованием оснований Шиффа. Карбодиимид взаимодействует с первичными аминогруппами только одноцепочечной ДНК.²¹

Авторы работ^{63, 64} указывают на возможность образования связи между ДНК и белком путем координации через ион Cr^{6+} в виде симметричного ковалентного или координационного комплекса ДНК с ферментом полиаденозилдифосфорибозилсинтетазой. Этот вид связывания не изучен, хотя конъюгаты уже выделены.

2. Активация нуклеиновых кислот

Одним из методов активации нуклеиновых кислот является кислотная обработка, которая приводит к апуринизации ДНК. Альдегид, образующийся в результате раскрытия фуранозного цикла, может реагировать с аминогруппами белка с образованием основания Шиффа.⁶⁵ Однако использовать непосредственно эту реакцию для получения ковалентных белково-нуклеиновых комплексов не представляется возможным, так как низкие значения pH и высокая ионная сила в процессе кислотной обработки мешают образованию специфических НК-белковых комплексов. Поэтому Левиной и соавт.⁶⁶ предложено предварительно алкилировать ДНК по гуаниновому и адениновому остаткам с помощью диметилсульфата с последующим нагреванием в нейтральной среде. Образующиеся альдегидные группы в ДНК взаимодействуют с аминогруппами белка. Далее в результате β-элиминирования происходит разрыв одной из цепей ДНК в месте присоединения к белку. Такой подход позволил определить места контакта ДНК с белком в нуклеосомах⁶⁷ и в комплексах РНК-полимеразы с промотором lacUV5.⁶⁸

Аналогичный метод был использован для зондирования структуры гиперацетилированной области нуклеосом. Ядра клеток обрабатывали диметилсульфатом в течение 12 ч, затем проводили апуринизацию ДНК пиперидином с последующим восстановлением боргидридом натрия. В результате получали ковалентно связанные ядерные частицы, в которых ДНК была присоединена к гистонам H1/H5.⁶⁹

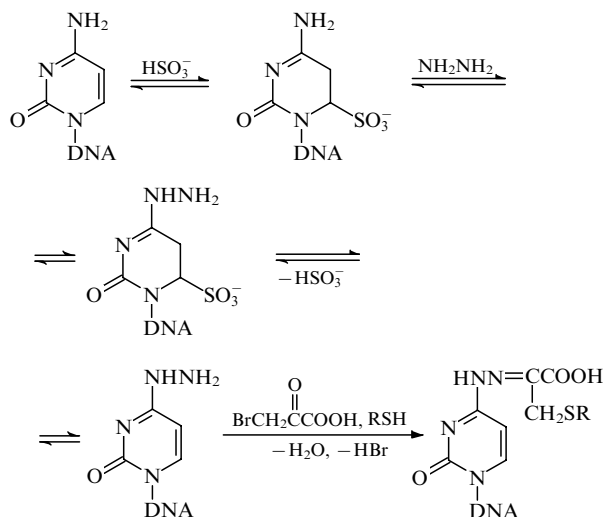
В работе⁷⁰ этот метод в сочетании с двумерным диагональным электрофорезом применяли для идентификации белков, образующих дискриминационные контакты с ДНК, в вирусе коровьей оспы.

Недостатком метода апуринизации ДНК, используемого для ковалентного присоединения ДНК к ДНК-специфичным белкам, является искажение пространственной структуры двойной спирали ДНК, возникающее из-за множественного метилирования гетероциклических оснований.

Другим методом получения белково-нуклеиновых конъюгатов является модификация фрагментов НК по гетероциклическим основаниям и фосфатным группам активными алкилирующими агентами.

В работе⁷¹ предложен способ введения бромацетильного остатка в цитидин (схема 6). Гидразиновая группа, введенная в положение 4 цитозинового кольца, взаимодействует с бромпируватом, который присоединяет SH-группу белка. В качестве донора группы SH в модельной системе был использован глутатион. Подобраны оптимальные условия для этой реакции. Таким способом был получен ковалентно связанный комплекс РНК с белком в 30S рибосомной субчастице *E. coli*.⁷¹

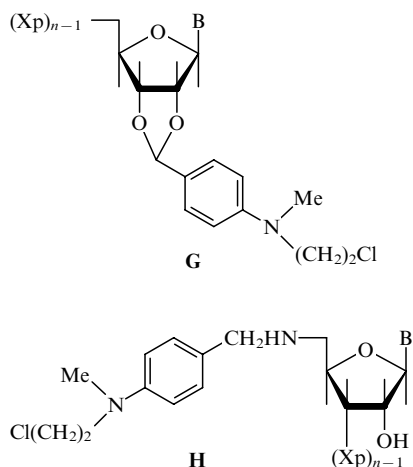
В работе⁷² бромацетильный остаток присоединяли к 5'-фосфатной группе олигодезоксирибонуклеотида. Полу-



R — белок

ченное активное производное олигонуклеотида — $\text{BrCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NH-d}(\text{pTCTAG})$ — использовали для аффинной модификации белка гена 5 бактериофага f1. Условия реакции «пришивки» являлись оптимальными для образования специфического белково-нуклеинового комплекса. Максимальный выход ковалентного комплекса составил 20% при времени реакции 24 ч. Снижение выхода белково-нуклеинового комплекса в присутствии хлорида натрия (до 1.3%) и в присутствии конкурентных ингибиторов «пришивки» — олигонуклеотидов, не содержащих алкилирующую группу (до 9.4%) — доказывает специфичность «пришивки». Поскольку бромацетат взаимодействует с нуклеофильными центрами белка, авторы работы⁷² предположили, что происходит алкилирование группы SH цистеинового остатка белка гена 5 бактериофага f1.

Для изучения топографии рибосом были предложены производные олигорибонуклеотидов, содержащие алкилирующие группы на 2',3'- (G) или на 5'-конце (H).



X — остаток рибонуклеозида,

B — остаток гетероциклического основания.

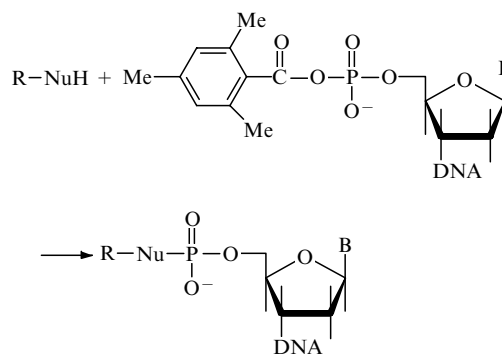
Соединения G и H являются активными алкилирующими агентами и вступают в реакции с рибосомными белками. Оптимальным временем реакции считают время, необходимое для полупревращения *N*-хлорэтил-*N*-метиламиногруппы в этилениммониевый катион в результате отщепления иона хлора. Реакционные смеси инкубируют

при 25 и 37°C. Выход ковалентного белково-нуклеинового комплекса составляет от 10 до 30%.⁴⁹

Данный метод введения активной группы имеет недостаток, связанный с модифицированием только концевых остатков олигорибонуклеотидов, но имеет много достоинств благодаря активности алкилирующих групп.

Для аффинной модификации белков используют также аналоги НК, содержащие активированные концевые фосфатные группы. В роли активаторов применяют циклический замещенный триметафосфат и *N*-циклогексил-*N'*-(4-метилморфолино)этилкарбодимид. Время реакции — 10 мин, выходы продукта «пришивки» к рибосомным белкам — от 1 до 7.5%.⁴⁹

Смешанные ангидриды фосфорной и мезитиленкарбоновой кислот в водной среде могут фосфорилировать различные соединения, содержащие нуклеофильные группы, например, первичные и вторичные амины, меркаптосоединения.⁷³ Это делает возможным их применение в реакции с белком. Мезитоилированные по концевому фосфату аналоги НК были использованы для ковалентного присоединения к РНКазе А,⁷⁴ митохондриальной АТФазе, миозину^{73, 75, 76} и другим белкам (схема 7).

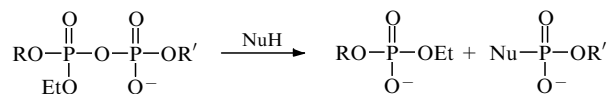


R — белок, Nu — нуклеофильная группа белка,
B — остаток гетероциклического основания.

Достоинствами мезитоильных производных олигонуклеотидов являются их устойчивость в водных средах и невысокая реакционная способность, снижающая вероятность неспецифической модификации белка. По данным работы⁷⁷ реакции смешанных ангидридов мезитиленкарбоновой и фосфорной кислот с сильными нуклеофилами протекают в течение нескольких часов, со слабыми — в течение нескольких суток. За результатами ковалентного присоединения смешанного ангидрида мезитиленкарбоновой кислоты и АТФ или АМФ к миозину следили по необратимому ингибированию фермента. Время реакции составляло 1–2 ч. Для получения конъюгата РНКазы А с олигодезоксирибонуклеотидом использовали такие реагенты, как $\text{d}(\text{MsC}(\text{O})\text{pArArA})$, $\text{d}(\text{ArArArMsCO})$ и $\text{d}(\text{MsC}(\text{O})\text{pTrArGpT})$, где Ms — остаток 2,4,6-триметилбензойной кислоты. Для комплексов с высокой константой ассоциации выход конъюгата составил 2–4% в расчете на белок при времени реакции 7 дн. Уменьшение выхода ковалентного белково-нуклеинового комплекса до 0%, которое отмечается при постепенном увеличении ионной силы раствора и при использовании комплексов с низкой константой ассоциации, доказывает специфичность «пришивки».⁷⁴

Шабаровой и соавт.⁷⁸ в качестве аффинных реагентов для ковалентного присоединения к НК-узнающим белкам были предложены ДНК-дуплексы, содержащие в заданном положении углеводфосфатного остова замещенную пиррофосфатную группировку вместо природной фосфодиэфирной связи. Установлено, что в одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидах в водной среде ангидридная связь замещенной пиррофосфатной группировки легко и количественно рас-

цепляется у атома фосфора под действием нуклеофильных агентов по механизму нуклеофильного замещения. Замещение сопровождается образованием ковалентной связи между фрагментом олигодезоксирибонуклеотида, связанным с дизамещенной фосфатной группой, и нуклеофилом.



NuH — нуклеофильный агент,
RO и R'O — фрагменты олигодезоксирибонуклеотидов.

Было показано, что в качестве нуклеофилов могут выступать функциональные группы боковых цепей глутаминовой кислоты и аргинина.⁷⁹

Содержащие замещенную пирофосфатную группировку ДНК-дуплексы были успешно применены для аффинной модификации ферментов рестрикции — модификации *RsrI* и *EcoRI*⁸⁰ и эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*.⁷⁹ Эти ферменты «узнают» определенные участки в ДНК и гидролизуют (эндонуклеазы рестрикции) или метилируют (ДНК-метилтрансферазы) их в строго определенных местах. Была доказана специфичность их ковалентного присоединения к ДНК-дуплексам с монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью.^{79, 80}

Достоинства реагентов такого типа заключаются в том, что замещенная пирофосфатная группировка не вносит серьезных изменений в структуру ДНК-дуплексов; химическая реакция между нуклеофильной группой белка и активной группой субстрата протекает при «нулевом расстоянии» между ними и в отличие от фотоактивных реагентов не требует активации извне (например, УФ- или γ -облучения). Это предотвращает возможность искажения реальной картины белково-нуклеиновых контактов при интерпретации результатов. К недостаткам применения ДНК-дуплексов, содержащих замещенную пирофосфатную межнуклеотидную группировку, для аффинной модификации белков относятся необходимость близкого расположения нуклеофильной группы белка и активированной группировки НК, а также лабильность связи, образующейся между 5'-фосфатной группой олигодезоксирибонуклеотида и некоторыми аминокислотными остатками.

IV. Ковалентное присоединение нуклеиновых кислот к ферментам, основанное на использовании механизма функционирования последних

В процессе взаимодействия фермента с нуклеиновой кислотой возможно формирование ковалентно связанного белково-нуклеинового интермедиата, который потом распадается с образованием продукта реакции. Для того чтобы осуществить ковалентное присоединение белка к НК с целью изучения структуры комплекса методом РСА или для определения аминокислоты, взаимодействующей с субстратом, достаточно зафиксировать этот комплекс на стадии образования ковалентного соединения фермента с НК.

Одним из примеров использования ферментативной реакции для получения ковалентных аддуктов ферментов с аналогами НК (субстратами) является изучение тимидилатсинтетазы при взаимодействии с 5-фтор-2'-дезоксидеоксиридинмонофосфатом (fl^5dUMP). Тимидилатсинтетаза — это фермент, который переносит метильную группу с 5,10-метилентетрагидроfolата на уридин с образованием тимидина. При взаимодействии белка с двумя субстратами постулируется образование нековалентного тройного комплекса, который переходит в ковалентный аддукт белка с уридином. Тиольная группа фермента атакует положение 6 урацильного остатка

так, чтобы атом С(5) мог реагировать как карбанион с метилентетрагидроfolатом.⁸¹ После переноса метильной группы с метилентетрагидроfolата на положение 5 уридина происходит элиминирование группы белка из положения 6 одновременно с протоном из положения 5. Если вместо удаляемого атома водорода ввести атом фтора, то реакция будет блокирована на стадии элиминирования белка.⁸²

В пользу образования ковалентного аддукта свидетельствует также снижение роста клеток лимфоцитов на среде, содержащей fl^5dUMP , причем количественные характеристики процесса совпадают с таковыми для инактивации тимидилатсинтетазы, т.е. ингибирование роста клеток объясняется взаимодействием модифицированного нуклеотида с этим ферментом.⁸²

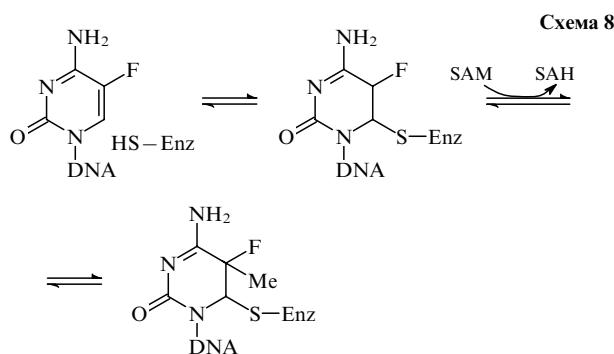
Использование метода ковалентного присоединения интересно тем, что он позволяет точно определить стадию, на которой фиксируется комплекс, выявить роль ковалентно связанного аминокислотного остатка, при этом модифицированный нуклеотид претерпевает те же самые конформационные изменения, что и субстрат. Таким образом, применение подобных реагентов открывает доступ к ранее неизученным ступеням катализа.⁸³ Так, в работах^{84, 85} изучали стереохимический механизм метилирования дезоксиуридилата на примере ковалентного тройного комплекса тимидилатсинтетазы с fl^5dUMP и 5,10-метилентетрагидроfolатом или 10-пропаргил-5,8-дидезазаfolатом. Высокая стабильность комплексов позволила получить кристаллы и изучить их структуру методом РСА. Показано, что при образовании тройного комплекса тимидилатсинтетаза претерпевает конформационные перестройки, затрагивающие четыре аминокислотных остатка на С-конце белка, которые находятся в непосредственной близости от ароматического кольца ингибитора fl^5dUMP .⁸⁵ Предполагается, что перед элиминированием продукт реакции претерпевает конформационную изомеризацию, обсуждаются пути ее реализации.⁸⁴

К числу ферментов, образующих в процессе реакции ковалентные конъюгаты с субстратом, относятся ДНК(С(5)-цитозин)метилтрансферазы. Практически доказано, что все они функционируют по универсальному механизму, согласно которому на первой стадии нуклеофильная аминокислота присоединяется по положению 6 модифицируемого цитозина. На второй стадии происходит перенос метильной группы с кофактора SAM на атом углерода С(5) цитозина. Введение заместителя, который связан с атомом углерода более прочной связью, чем водород, в положение 5 модифицируемого основания фиксирует белково-нуклеиновый комплекс на стадии ковалентного аддукта. В качестве такого заместителя предложено использовать атом фтора.⁸⁸

В работе⁸⁶ изучали взаимодействие фермента модификации *EcoRII* с ДНК-дуплексом, содержащим остаток азацитина. Образование аддукта было зафиксировано электрофоретически. Показано, что введение в клеточную систему молекулы азацитина приводит к резкому росту экспрессии данного гена. Принимая во внимание ингибирующее действие такого реагента на метилазу *EcoRII*, этот факт можно рассматривать как доказательство отрицательной регуляции ферментом экспрессии своего гена.⁸⁷

Содержащие остаток 5-фтор-2'-дезоксидеоксицитидина (fl^5dC) ДНК-дуплексы применяются для определения аминокислотных остатков, участвующих в каталитическом акте при метилировании ДНК ДНК(С(5)-цитозин)метилтрансферазами. Выделен конъюгат метилазы *HaeIII* с ДНК-дуплексом, содержащим fl^5dC . Субстрат в конъюгате был прометилирован по атому С(5) гетероциклического основания. Из-за наличия фтора в положении 5 цитозина отщепления белка от атома С(6) не произошло.⁸⁸ Были выделены аналогичные конъюгаты ДНК-дуплексов, содержащих fl^5dC , с ферментами *EcoRII*,^{89, 90} *HhaI*⁹¹ и *dem*-метилтрансферазой

E. coli K-12.⁹² Наличие ковалентного комплекса определяли электрофоретически и детектировали при помощи авторадиографии. Проверили устойчивость аддукта в денатурирующих растворах — 6М мочеvine и 1%-ном растворе додецилсульфата натрия (SDS). После белковой денатурации связь между модифицированной ДНК и метилазой в присутствии кофактора сохранилась. Кинетическое изучение реакции показало, что как ферментативный процесс метилирования, так и реакция ковалентного присоединения белка к ДНК имеют первый порядок. Полученные данные подтверждают предложенный ранее механизм реакции (схема 8).



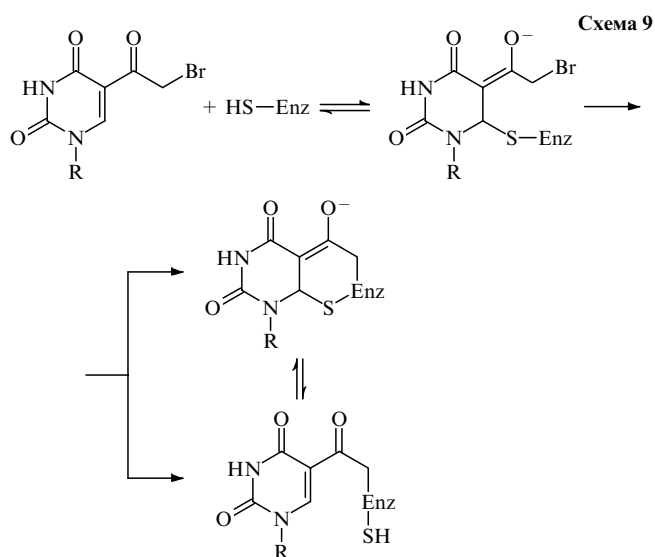
SAM — S-аденозил-L-метионин,
SAH — S-аденозил-L-гомоцистеин,
Enz — фермент.

Анализ полученных аддуктов показал, что во всех случаях ковалентную связь с атомом углерода в положении 6 цитозина образует остаток Суs.^{89,90,92} Дальнейшие исследования в этом направлении открывают возможность для детального описания стереохимического пути реакции переноса метильной группы.⁹¹

Универсальность, постулированная для ДНК(С(5)-цитозин)метилтрансфераз, распространяется и на метилтрансферазы, которые взаимодействуют с РНК. В работе⁹³ объектом исследования стала тРНК(м⁵U54)метилтрансфераза. Был получен ковалентный аддукт этого фермента с тРНК, содержащей остаток fl⁵dU. Оказалось возможным зафиксировать ковалентный комплекс тРНК(м⁵U54)метилтрансферазы с РНК, который был стабилен при обработке на нитроцеллюлозном фильтре и в условиях электрофореза в денатурирующих условиях. Показано, что такие аддукты способны участвовать в дальнейшей реакции метилирования, причем процесс их образования является обратимым.⁹⁴

Описано получение промежуточных ковалентных комплексов топоизомераз с ДНК. Топоизомеразы — это ферменты, которые изменяют количество супервитков в циклических ковалентно замкнутых ДНК, инициируя одноцепочечные разрывы в ДНК.⁹⁵ Топоизомеразы вируса коровой оспы типа I специфически связываются с ДНК и образует ковалентные аддукты путем расщепления фосфодиэфирной связи и формирования новой связи с концевой фосфатной группой, образовавшейся в месте разрыва. Фермент узнает в ДНК консервативную последовательность 5'-(С/Т)ССТТ-3'. После разворачивания цепи ДНК фермент переносит связанный с ним конец ДНК на 5'-концевой участок этой же цепи с регенерацией ковалентно замкнутого кольца плазмиды. Наличие ковалентных конъюгатов на промежуточной стадии было доказано с помощью переноса олигонуклеотидного остатка с комплекса на 5'-конец олигонуклеотида, а также с помощью блокирования ферментативной реакции антибиотиком, ингибирующим действие топоизомераз, благодаря чему цепь ДНК остается разорванной.⁹⁶

В работе⁹⁷ предложено использовать необратимые ингибиторы ферментативной реакции. Для ингибирования тими-

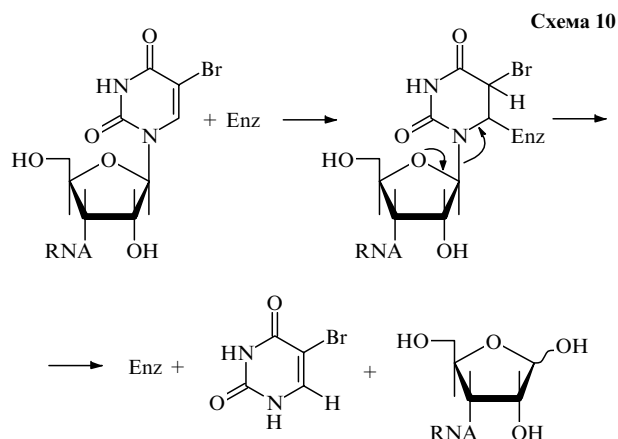


R — остаток трифосфатрибозы

дилатсинтетазы применяли аналог уридинтрифосфата, содержащий в положении 5 одну из активных групп: COCH₂Br, CH₂NHCOCH₂I или NO₂. Такие соединения превращают обратимые фермент-ингибиторные комплексы в необратимые ковалентно связанные. Механизм их действия точно не определен, но предложен возможный путь этого процесса (схема 9).

Применяя рассматриваемые реагенты, также можно зондировать группы атомов в белке, которые участвуют в процессе метилирования гетероциклического основания.

Интересный метод использования тРНК, содержащей остаток br⁵U, для ковалентного присоединения к аминоксил-тРНК-синтетазе без активации УФ-светом описан в работе.⁹⁸ Хотя существует значительное число доказательств образования промежуточного ковалентного аддукта между аминоксил-тРНК-синтетазой и урацильным циклом, такие соединения ранее не были получены. Введение атома галогена, имеющего высокую электроотрицательность, в гетероциклическое основание приводит к увеличению чувствительности атома углерода в положении 6 к нуклеофильным реагентам. Поэтому аддукты с галогенированными соединениями урацила способны к дальнейшим перегруппировкам, приводящим к образованию ковалентного фермент-субстратного комплекса. Развитие этого процесса приводит к образованию бромурацила, появлению остатка рибозы в том месте, где раньше был 5-бромурацил, и свободного фермента по схеме 10.



Были подобраны оптимальные условия для предотвращения распада ковалентного комплекса: использование сульфидрильного восстанавливающего агента и 10-кратного избытка 5-бромуридина. Успешность применения нового метода продемонстрирована на примере аланиновой аминоксил-тРНК-синтетазы. Исследована инактивация фермента под действием Br^5U -содержащей тРНК. Показано, что отщепление урацила приводит к регенерации активности белка. Полученные результаты являются доказательством существования промежуточного ковалентного аддукта при функционировании аминоксил-тРНК-синтетаз.

V. Методы идентификации и выделения ковалентных ДНК-белковых комплексов

Для идентификации и выделения ковалентных аддуктов нуклеиновых кислот и белков используют, например, способность одного из компонентов комплекса адсорбироваться на носителе, а также различие в химических или физико-химических свойствах нуклеиновой части ковалентного аддукта и его белковой составляющей. Так, ДНК в отличие от белка связывается с нитроцеллюлозным фильтром только при определенных условиях. В то же время ДНК, ковалентно присоединенная к молекуле белка, имеющей сродство к какому-либо полимерному носителю (например, нитроцеллюлозе), приобретает свойство оседать на таких фильтрах. Новое свойство можно использовать для отделения прореагировавшей ДНК от свободной, а также для доказательства факта ковалентного присоединения.

Свойством белка, которое можно использовать для идентификации ковалентного аддукта, является иммунный ответ, т.е. образование специфического комплекса данного белка с антителом. В этом случае иммунохимический подход может быть применен для выделения ДНК-белковых конъюгатов и их очистки.

В свою очередь белок, связанный с НК, также приобретает новые черты, характерные для нуклеинового компонента. Одно из применений такого явления — седиментационный метод выделения «пришитого» белка в случае, если он достаточно мал и не изменяет константу седиментации свободной нуклеиновой кислоты в градиенте плотности. При облучении *in vivo* клеток или клеточных ядер это свойство оказывается очень полезным для выделения конъюгатов из сложных клеточных систем. Например, первой стадией очистки ковалентных аддуктов хромосомных белков с ДНК из клеток культуры тканей *D. melanogaster* было центрифугирование в градиенте CsCl для выделения клеточных фракций, содержащих ДНК.⁴ Для этих целей можно использовать также гель-фильтрацию.

Экстракционные методы выделения конъюгатов связаны с растворимостью одного из компонентов в органическом веществе, например, белка в феноле. Растворимость белкового компонента в органической среде способствует переносу ковалентно связанной НК в органическую фазу, тогда как непрореагировавшая НК остается в водном растворе.²¹

Ниже приведены примеры использования методов, наиболее часто употребляемых в практических исследованиях.

1. Связывание с полимерным носителем

В работе¹⁸ для выделения ковалентных комплексов метилтрансферазы *Dam* из *E. coli* с SAM использовали осаждение белковой части конъюгата на стеклянном фильтре 10%-ной трифторуксусной кислотой. Наличие ковалентной связи метилтрансферазы с кофактором доказывали с помощью радиоактивной метки (^3H или ^{14}C), содержащейся в SAM. Для контроля аналогичную процедуру проводили с нековалентным комплексом метилтрансферазы с SAM.

Ковалентные аддукты ДНК-узнающего белка из аденовируса типа 2 с ^{32}P - $\text{p}(\text{dT})_{14}$ фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры и промывали растворами, содержащими NaCl или SDS для разрушения нековалентных специфических комплексов. Выход ковалентного белково-нуклеинового комплекса определяли по радиоактивности остатка на фильтре. Такой же подход (связывание на нитроцеллюлозном фильтре) применяли для очистки ковалентных аддуктов тРНК($\text{m}^5\text{U}54$)метилтрансферазы и РНК.⁹³ В работе¹⁶ вместо нитроцеллюлозных фильтров использовали бумажные фильтры *Toyo Roshi* 51.

Для выделения белков из ядерного экстракта мышинных В-клеток гибридомы, участвующих в специфическом узнавании определенных последовательностей ДНК, использовали облучение УФ-светом их комплексов с олигонуклеотидами, включающими не только участок связывания, но и 10-звенную dA -последовательность на 3'-конце. Полученные ковалентные аддукты выделяли на олиго- dT -целлюлозе. В данном случае очистка комплекса от «непришитых» белков достигалась за счет образования дуплекса олиго- dA ·олиго- dT на полимерной матрице.⁹⁹

Еще одним примером использования полимерного носителя для выделения НК-белковых конъюгатов является гибридизация продуктов обработки формальдегидом клеток *E. coli* с иммобилизованной на целлюлозе одноцепочечной ДНК, комплементарной плазмиде *pBR322*. При этом происходит отделение конъюгатов мРНК и ДНК *pBR322* с белками от остального клеточного материала. После отщепления от ковалентного комплекса РНК, белковые компоненты анализировали с помощью электрофоретических методов (по Лэмбли).⁵⁹

2. Электрофоретические методы выделения

Электрофорез является наиболее эффективным способом выделения ковалентно связанных НК-белковых конъюгатов. В электрофоретических методах анализа возможно одновременное определение как белкового компонента (путем прокрашивания соответствующим красителем), так и нуклеиновой кислоты (по ^{32}P -радиоактивности). Существуют два варианта этого метода, различающихся наличием или отсутствием денатурирующего агента в поддерживающей среде.

Так, в работе¹⁰⁰ описано выделение ковалентных белково-нуклеиновых комплексов методом «торможения» в 1%-ном агарозном геле, не содержащем денатурирующих агентов. Ковалентные аддукты топоизомеразы *E. coli* с олигонуклеотидом также идентифицировали в неденатурирующем 4.5%-ном полиакриламидном геле.⁹⁶

Двумерный электрофорез в неденатурирующей среде обладает большей разрешающей способностью. В этом случае сначала проводят разделение реакционной смеси в одном направлении, после чего один из компонентов белково-нуклеинового комплекса подвергают деградации химическим или ферментативным путем и выполняют электрофорез в перпендикулярном направлении.²¹ Таким образом идентифицировали ДНК-связывающие белки вируса коровьей оспы, ковалентно присоединенные к вирусной ДНК. Электрофоретическое разделение в первом направлении проводили в полиакриламидном геле (линейный градиент концентраций акриламида — от 5 до 15%). Во втором направлении концентрация акриламида была постоянной и составляла 12.5%. Белки детектировали по радиоактивности ^{125}I , введенного при помощи реагента Болтона–Хантера. Набор реперных белков, применявшихся при электрофорезе во втором направлении, давал возможность определять молекулярные массы «пришитых» белков.

Однако применение неденатурирующих гелей обычно не дает полной уверенности в том, что белково-нуклеиновый

комплекс является действительно ковалентным. Поэтому в гель вводят денатурирующие агенты, например SDS или мочевины. Обычно используют гель-электрофорез в варианте Лэмли с SDS в качестве денатурирующего агента. Концентрация геля в различных работах варьировалась от 10 до 15%.^{10, 17, 19, 25, 29, 33, 34, 87, 101, 102} Предварительная обработка проб SDS с 2-меркаптоэтанолом, включающая выдерживание в течение нескольких минут при 95°C, гарантировала полное разрушение нековалентных белково-нуклеиновых комплексов, а также денатурацию белка. Присоединение фрагментов НК к белку незначительно влияет на электрофоретическую подвижность последнего, поскольку нивелируется большим отрицательным зарядом SDS, а увеличение массы белка при «пришивке» к нему нуклеотида или олигонуклеотида пренебрежимо мало по сравнению с собственной массой белка. Обычно после проведения электрофоретического разделения гели окрашивают красителем Кумасси для определения белковых зон, а затем сушат и проводят автордиографию для визуализации фрагментов НК. В работе⁵ перед определением положения комплексов в геле их переносили электроблоттингом на нитроцеллюлозную мембрану.

После облучения комплексов полипептида, содержащегося в транскрипционном комплексе гороха, с ДНК, содержащей br^5dU , образцы обрабатывали ДНКазой I (в некоторых экспериментах проводили дополнительную обработку фосфодиэстеразой змеиного яда).²⁸ После этого их анализировали с помощью электрофореза в разбавленном (5%-ном) полиакриламидном геле.

Аналогичным образом проводили разрушение нуклеиновой кислоты нуклеазой микрококков и бактериальной щелочной фосфатазой после ковалентного присоединения ДНК к гистонам. Затем в остаточный олигонуклеотид вводили ^{32}P -метку с помощью полинуклеотидкиназы (перед нанесением на 15%-ный полиакриламидный денатурирующий гель).⁶⁹ Необходимость деградации ДНК обусловлена ее большими размерами и, соответственно, низкой электрофоретической подвижностью.

Частичному расщеплению можно подвергать также белковую часть комплекса с нуклеиновой кислотой. Для этой цели применяют *N*-хлорсукцинимид. После обработки комплексов *N*-хлорсукцинимидом реакционную смесь наносят на 10%-ный полиакриламидный гель, содержащий SDS. Положение зон частично деградированного белково-нуклеинового комплекса определяют автордиографически. Набор продуктов частичного распада таких соединений под действием *N*-хлорсукцинимид специфичен для каждого белка и может быть использован для быстрого определения макромолекул, узнающих определенную последовательность в ДНК или РНК.¹⁰³

Активатор транскрипции GCN4 из дрожжей после ковалентного присоединения к ДНК анализировали электрофорезом в геле с другим типом денатурирующего агента — мочевины. Для денатурации «несшитых» комплексов реакционные смеси обрабатывали щелочью и наносили на 10%-ный полиакриламидный гель, содержащий 8 М мочевины. Ковалентный белково-нуклеиновый комплекс детектировали автордиографически.³⁰

3. Хроматографические методы выделения

Хроматографические методы реже используются для анализа ковалентно связанных комплексов белков с ДНК, поскольку требуются большие количества веществ для спектрофотометрического детектирования продуктов реакции. Тем не менее, например, в работе²⁶ смесь *lac* репрессора с ДНК, содержащей br^5dU , после облучения УФ-светом разделяли хроматографически с использованием колонки с сефарозой. При использовании 200 мМ калий-фосфатного буфера, содержащего 500 мМ KCl, несвязанный репрессор

отделялся от ковалентного комплекса, о чем свидетельствовал хорошо разрешимый пик. За процессом разделения следили спектрофотометрически по поглощению при 260 и 280 нм.

Ковалентный комплекс T4 эндонуклеазы V с олигонуклеотидом, содержащим фенилдиазиринное производное, выделяли на колонке с фосфоцеллюлозой.³⁹

Эффективным оказался метод выделения ковалентных комплексов метилтрансферазы *HaeI* с олигонуклеотидом, содержащим остаток fl^5dC , методом скоростной белковой жидкостной хроматографии (FPLC) на колонке MonoQ в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 1 М.⁸⁸

4. Иммунохимические методы выделения НК-белковых ковалентных комплексов

В литературе описано несколько примеров использования иммунохимических методов выделения НК-белковых ковалентных комплексов.

Белок репликации А облучали вместе с олигонуклеотидами. После реакции белок и ковалентный белково-нуклеиновый комплекс отделяли от непрореагировавших олигонуклеотидов с помощью моноклональных антител. Далее реакционную смесь анализировали методом торможения в геле.¹³

Белки из экстракта клеточной цитоплазмы, *in vitro* ковалентно присоединенные к НК, выделяли при помощи антител, которые получали вакцинацией мышей.⁵

После ковалентного присоединения гистонов к ДНК высокомолекулярные комплексы выделяли при помощи антител, специфичных к ацелированным гистонам.⁶⁹

Для определения белкового компонента ковалентного аддукта использовали иммунное осаждение одного из белков фактора транскрипции II (TFII) после его ковалентного присоединения к ДНК в результате облучения УФ-светом.⁴²

VI. Определение пептидов в белке, ковалентно связанном с нуклеиновой кислотой

Конечной целью ковалентного присоединения белка к НК является определение аминокислот или участков белка, образующих контакты с нуклеиновыми кислотами. Для этого после ковалентного присоединения белок фрагментируют и определяют ту его часть, которая образует ковалентный аддукт с НК. Для этой цели используют большое количество методов — как химических, так и ферментативных.¹⁰⁴ Мягкий кислотный гидролиз в зависимости от условий приводит к образованию больших или малых фрагментов белка, но его действие, как правило, неспецифично к определенным аминокислотным остаткам, и полученный набор пептидов не воспроизводится при повторном гидролизе того же белка. Некоторое влияние на этот процесс оказывает вторичная и третичная структуры белка. Существуют также реагенты, расщепляющие пептидную связь с N- или C-конца от определенной аминокислоты, например, BrCN специфично гидролизует связь в белках, если на N-конце расположен метионин.^{105, 106} Бромциан применялся для определения ДНК-связывающих доменов ферментов рестрикции *EcoRI* и *EcoRV* после их облучения УФ-светом в комплексе с ДНК-дуплексами, содержащими остатки br^5dU . Поскольку метионин редко встречается в белках, это позволило локализовать только те области в ферментах, с которыми была связана ДНК.²⁵ Недостатком этого метода являются жесткие условия обработки (80%-ная муравьиная кислота), при которых оказываются стабильными только связи типа C—C, образующиеся при облучении УФ-светом комплексов белков и НК.

Ферментативная фрагментация белковой части ковалентного аддукта с НК протекает в более мягких условиях и при применении определенных протеиназ является довольно специфичной. Различают редко- и частощепящие протеи-

назы, что в первую очередь определяется их специфичностью, а также тем, как часто встречаются в белках некоторые аминокислоты. Например, эндопептидаза Lys-C расщепляет белки на достаточно крупные фрагменты, которые легче анализировать. Однако при использовании этого фермента не удается точно локализовать активный район белка. Наиболее часто употребляемым ферментом является трипсин. Он специфично расщепляет белок по пептидным связям, образованным карбоксильными группами лизина или аргинина.¹⁰⁴ Поскольку круг узнаваемых им аминокислот больше, чем у эндопептидазы Lys-C, то размер образующихся при расщеплении пептидов меньше, а их количество — больше. Это, с одной стороны, усложняет выделение ковалентно связанного с НК пептида, но, с другой, — точнее локализует «пришитую» аминокислоту.

При расщеплении ковалентных белково-нуклеиновых аддуктов протеолитическими ферментами образуется большой набор пептидов, который включает «непришитые» к НК фрагменты белка, один или несколько ковалентно связанных с НК пептидов и продукты гидролиза самой протеиназы, поскольку она также может гидролизовать собственные пептидные связи (автопротеолиз). Для того чтобы избежать автопротеолиза, используют специально модифицированный трипсин, который практически не подвергается самораспаду. Для более полного и исчерпывающего гидролиза белок также денатурируют 8 М мочевиной, но так как это может оказаться недостаточным, то его еще обрабатывают иодацетамидом.¹⁰⁷ После обработки иодацетамидом концентрацию мочевины можно снизить до 2 М, при этом эффективность расщепления трипсином резко возрастает, что позволяет снизить массовое соотношение трипсин:белок до 1:25. При таком значении автопротеолиз трипсина уже не является проблемой.¹⁰⁸ В табл. 3 представ-

лены наиболее часто используемые методы белковой фрагментации в ковалентных комплексах белков с НК. В каждом конкретном случае выбор условий протеолиза определяется эффективностью работы протеиназы (или химического реагента) и стабильностью белково-нуклеинового конъюгата. Поскольку НК может защищать белок от протеолиза, необходим индивидуальный подбор соотношения белок–протеиназа (или реагент) и способа денатурации белково-нуклеинового комплекса (мочевина или SDS).

После успешного фрагментирования белков в составе их ковалентных комплексов с НК возникает новая проблема — выделение одного или нескольких пептидов, которые были вовлечены в образование ковалентного аддукта с НК. В литературе описано несколько подходов к решению этой проблемы: использование электрофоретических методов, экстракция в органические растворители, различные виды хроматографической очистки. Подобраны условия электрофореза для разделения пептидов с молекулярной массой от 1 до 5 кДа.¹⁰⁹ Используется также фенольная экстракция пептидов. Обычно одной стадии очистки оказывается недостаточно для отделения целевого соединения от других веществ, поэтому практически всегда на какой-либо из ступеней очистки применяется колоночная хроматография.^{108, 109}

В табл. 4 приведены условия хроматографии, применяемые для выделения и очистки ковалентно связанных с НК пептидов. Для выбора колонки, сорбента, элюента и др. условий хроматографического разделения исследователь может использовать приведенные в литературе данные (см. табл. 4) с учетом индивидуальных особенностей изучаемого конъюгата.

После выделения и очистки определяют аминокислотную последовательность пептида.^{108, 110}

Таблица 3. Методы расщепления белкового компонента НК-белковых конъюгатов.

Фермент или реагент	Концентрация фермента (реагента) или массовое соотношение фермент : субстрат	Буферный раствор для протеолиза	Время, ч	Температура инкубации, °С	Ссылки
Трипсин	1 : 3.7	83.3 мМ Трис-НCl, pH 8.0, 16 мМ CaCl ₂ , 2М мочевины	72	37	51
	1 : 10	2М мочевины	4	37	34
	1 : 5000,	25 мМ Трис-НCl, pH 8.0,	0.3	20	29
	1 : 500,	1 мМ ЭДТА, 0.1 М NaCl			
	1 : 100				
	1 : 25	10 мМ Трис-НCl, pH 7.5, 4.8М мочевины, 0.1 М NaCl	18	25	31
ТРСК-трипсин	1 : 20	50 мМ NH ₄ HCO ₃ , pH 8.0, 2М мочевины	12 (или 48)	37 (или 20)	17
Химотрипсин	1 : 50,	25 мМ Трис-НCl, pH 8.0,	0.3	20	14
	1 : 100,	1 мМ ЭДТА, 0.1 М NaCl			
	1 : 200				
	1 : 100 ^a	100 мМ NH ₄ HCO ₃	16	37	16
Стафилококковая протеиназа V8	1 : 1,	25 мМ Трис-НCl, pH 8.0,	1	20	14
	1 : 25	1 мМ ЭДТА, 0.1 М NaCl			
	100 мкг · мл ⁻¹ ^a	50 мМ NH ₄ HCO ₃	16	37	89
	36 мкг · мл ⁻¹	50 мМ NH ₄ HCO ₃ , pH 8.0, 0.1 % SDS	12	37	17
Лизиновая эндопептидаза	5 пмоль	10мМ K ₃ PO ₄ , pH 6.5, 10 % этиленгликоль, 10 мМ меркаптоэтанол, 2 мМ ЭДТА	4	30	39
o-Иодобензойная кислота	15 мкг · мл ⁻¹ ^b	80 % AcOH, 4 М гуанидин, 1 %-ный крезол	24	20	17

^a Предварительная обработка иодацетамидом; ^b предварительная обработка 4-винилпиридином.

Возможны случаи, когда цель — определение пептида, ковалентно связанного с ДНК — оказывается недостижимой в силу нестабильности аддукта, недостаточных количеств белка, отсутствия необходимого оборудования. В этом случае используют косвенные данные для нахождения аминокислоты, «пришитой» к НК. В их числе — определение природы связи между НК и белком. Такое определение основано на различии реакционной способности функциональных групп и их гидролитической устойчивости.

Если НК присоединена к белку через концевую фосфатную группу, то из-за нестабильности ковалентного комплекса обычно возникают проблемы с определением пептида. Образующаяся в результате «пришивки» белка к гидроксаминокислотам фосфоди- или фосфотриэфирная связь является лабильной в щелочных условиях, причем на степень устойчивости связи влияет природа аминокислоты.

Так, аддукты с гидроксаминокислотами более чувствительны к щелочному гидролизу, чем аддукты с тирозином. Измеряя зависимость стабильности ковалентного белково-нуклеинового комплекса от pH можно сделать вывод о природе аминокислоты, связанной с НК. Доказать фосфодиэфирную природу связи можно при помощи фосфодиэстераз змеиного яда и селезенки телят, которые могут гидролизовать такие связи.¹¹¹

В работе⁸⁰ определяли природу связи между ферментом модификации *EcoRI* и олигонуклеотидом. Конъюгат оказался стабильным в 0.1 М растворе гидроксида натрия, но гидролизовался в 0.1 М соляной кислоте или 4 М растворе гидроксиламина при pH 5. Это позволило предположить образование ковалентной связи между фосфатной группой олигонуклеотида и аминогруппой Arg или Lys или иминогруппой His.

Таблица 4. Условия выделения ковалентно присоединенных к НК пептидов — продуктов протеолиза белково-нуклеиновых конъюгатов — хроматографическими методами (температура разделения не указана).

Колонка	Исходный элюент	Градиент ^b	Время разделения, мин	Расход элюента, мл·мин ⁻¹	Способ детектирования ^c	Ссылки
Delta-Pak C ₁₈ ; 7.8 × 300 мм ^a	10 мМ CH ₃ COONH ₄ , pH 6.5	70% CH ₃ CN	60	1	СФ (214)	18
Delta-Pak C ₁₈ ; 2 × 150 мм ^a	1.16% CF ₃ COOH	50% CH ₃ CN	60	0.2	СФ (214)	18
NAP-10	50 мМ NH ₄ HCO ₃	50 мМ NH ₄ HCO ₃	не указано	не указан	СФ	34
TSK ODS 120T; 4.6 × 250 мм	0.05% CF ₃ COOH	48% CH ₃ CN	50	0.8	СФ (220)	16
	5 мМ NH ₄ HCO ₃	80% CH ₃ CN	50	не указан	СФ (220), РА	16
SynChropak AX300 4.1 × 250 мм	20 мМ K ₃ PO ₄ , pH 6.8, 5% C ₂ H ₅ OH, 50 мМ KCl	1 М KCl	90	не указан	СФ (254), РА	14
Waters C ₁₈	100 мМ (C ₂ H ₅) ₃ N·CH ₃ COOH, pH 6.8	60% CH ₃ CN	50	не указан	СФ (254), РА	14
Aquapore RP-300; 4.6 × 250 мм	0.1% CF ₃ COOH	50% Pr ^t OH	20	1	СФ (220)	39
Beckmann ODS; 4.3 × 250 мм	50 мМ (C ₂ H ₅) ₃ N·CH ₃ COOH	70% CH ₃ CN	45	0.5	СФ (222), РА	89
Hydropore-SAX; 4.6 × 100 мм	50 мМ трис-HCl, pH 7.5, 0.5 мМ ЭДТА, 10 мМ меркаптоэтанол	1 М NaCl	60	1	РА (³ H и ³² P)	51
μBondapak C ₁₈	10 мМ CH ₃ COONH ₄ , pH 6.0	80% CH ₃ CN	60	1	СФ (214), РА	17
	10 мМ CH ₃ COONH ₄ , pH 6.0, 15% CH ₃ CN	45% CH ₃ CN	60	не указан	СФ (214), РА	17

^aТемпература разделения 40°C; ^b приведен только градиентобразующий компонент, концентрация которого в исходном элюенте возрастает до указанной величины; ^c СФ — спектрофотометрический, в скобках указана длина волны в нм, РА — по радиоактивности.

VII. Применение метода ковалентного присоединения ДНК-специфичных белков к нуклеиновым кислотам для зондирования механизмов их взаимодействия

Метод ковалентного присоединения дает возможность косвенного изучения процесса белково-нуклеинового взаимодействия благодаря тому, что происходит фиксация специфического комплекса на стадии связывания, причем, варьируя параметры «пришивки», можно фиксировать различные стадии узнавания.

В работе¹¹² комплекс эндонуклеазы рестрикции *NaeI* с олигодезоксирибонуклеотидным дуплексом, содержащим остаток br^5dU , облучали УФ-светом с целью определения количества субъединиц фермента и молекул субстрата в каталитически активном фермент-субстратном комплексе. При фотоактивации субстрата в комплексе с белком происходило образование ковалентного комплекса. Увеличение времени реакции приводило к появлению еще одного конъюгата. Подвижность нового ковалентного комплекса в полиакриламидном геле соответствует макромолекуле с молекулярной массой, приблизительно в 2 раза большей массы одной субъединицы *NaeI*. Вероятно, результатом ковалентной «пришивки» при дополнительном времени облучения явилось присоединение к субстрату второй молекулы фермента. Этот факт дает еще одно подтверждение того, что эндонуклеаза рестрикции *NaeI* связывается с двумя молекулами субстрата в виде димера.

Еще большие возможности для косвенного изучения механизма белково-нуклеинового взаимодействия дает ковалентное присоединение НК к белкам под действием лазерного облучения. Благодаря очень короткому времени импульса оказывается возможным определять физико-химические параметры белково-нуклеинового узнавания — константы связывания.¹⁰¹ В исследовании¹⁰¹ метод «замораживания» равновесных состояний применялся для белка, кодируемого 32 геном бактериофага Т4 (gp32). Этот белок преимущественно связывается с одноцепочечными ДНК. Так как за время импульса белок не успевает перейти из одного конформационного состояния в другое, выход ковалентного присоединения пропорционален количеству белково-нуклеиновых комплексов, существующих в данный момент, которое определяется константой комплексообразования. Находили зависимость выхода продукта ковалентного присоединения от известной из литературных данных константы комплексообразования gp32 с олиго(dT) и рассчитывали константы равновесия для других аналогичных систем (например, для равновесия gp32 с олигонуклеотидами меньшей длины, для этих же комплексов в других буферных растворах, для аналогичных белков той же системы бактериофага Т4). Поскольку выход продукта ковалентного присоединения gp32 к (dT)_n в зависимости от длины олигомера растет скачкообразно (до $n = 7$ ковалентного присоединения gp32 к олигодезоксирибонуклеотиду практически не происходит, при $n = 7$ выход аддукта резко увеличивается), предположили, что минимальное место посадки белка gp32 на ДНК составляет семь нуклеотидных остатков. Повторное увеличение выхода образования ковалентных аддуктов при n кратном 7 подтверждает эту гипотезу, так как становится возможной посадка уже двух молекул gp32 на олигодезоксирибонуклеотид.¹⁰¹

Авторы работы¹⁰² в качестве объектов исследования выбрали белки, кодируемые генами 44 (gp44), 45 (gp45), 62 (gp62) бактериофага Т4, которые нуждаются в кофакторах нуклеотидной природы, а также ионах Mg^{2+} . В отсутствие gp45, а также при его низких концентрациях ДНК преимущественно образует ковалентные аддукты с gp44, но начиная с эквимолекулярного соотношения gp45 и комплекса gp44/gp62 повышается эффективность аффинной модифика-

ции gp62. Поскольку белок gp45 обладает ДНК-зависимой АТФазной активностью, продемонстрировано влияние gp62 на кинетические параметры функционирования gp45. Характер зависимости ковалентного присоединения gp44 и gp62 от концентрации gp45 говорит о конформационной перестройке ДНК-узнающей системы бактериофага Т4 при эквимолекулярном соотношении всех компонентов. Зная выходы продуктов ковалентного присоединения рассматриваемых белков к (dT)₁₆, (dT)₂₀, (dT)₁₆·(dA)₂₀, (dA)₁₆·(dT)₂₀, (dT)₂₀·(dA)₂₀, имитирующих одноцепочечную ДНК, комплексы праймера и матрицы и ДНК-дуплексы с «тупыми» концами, можно определить расположение gp32, gp45, gp62 на праймере, на матрице или на комплексе праймера и матрицы.

Суммируя сказанное выше, надо отметить, что изменение эффективности аффинной модификации НК белками отражает конформационные переходы, а также более сложные многосубъединичные взаимодействия последних.¹⁰¹

VIII. Заключение

Таким образом, применение метода аффинной модификации открывает широкие возможности для анализа структуры и механизмов функционирования белков, взаимодействующих с НК. Главное требование к способу ковалентного присоединения белка к НК — создание оптимальных условий для белково-нуклеинового узнавания. Проводимые модификации не должны серьезно искажать структуру компонентов комплекса и тем самым нарушать процесс узнавания аналогов нуклеиновых кислот НК-специфичными белками. В этом смысле, на наш взгляд, наиболее перспективны бром- и азидозамещенные аналоги НК, а также НК, содержащие активированную межнуклеотидную фосфатную группу. Умеренная реакционная способность таких соединений обеспечивает специфичность ковалентного присоединения, так как реакция с белком становится возможной благодаря сближению именно реагирующих центров обоих компонентов комплекса.

Литература

1. T.M.Cao, M.T.Sung. *Biochemistry*, **21**, 3419 (1982)
2. G.R.Kunkel, U.G.Martinson. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 4263 (1978)
3. I.Saito, H.Sugiyama, T.Matsuura. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 6989 (1983)
4. S.V.Belikov, A.I.Belgovsky, O.V.Preobrazhenskaya, V.L.Karpov, A.D.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1031 (1993)
5. R.Pelle, N.B.Murphy. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2453 (1993)
6. D.S.Gilmour, J.T.Lis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4275 (1984)
7. Z.Hillel, C.-W.Wu. *Biochemistry*, **17**, 2954 (1978)
8. G.F.Strniste, D.A.Smith. *Biochemistry*, **13**, 485 (1974)
9. M.Buck, W.Cannon. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 1119 (1994)
10. R.Mital, Y.Albrecht, D.Schumperli. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1049 (1993)
11. C.S.Park, Z.Hillel, C.-W.Wu. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 5895 (1980)
12. V.T.Yue, P.R.Schimmel. *Biochemistry*, **16**, 4678 (1977)
13. E.Seroussi, S.Lavi. *J. Biol. Chem.*, **268**, 7147 (1993)
14. V.Cleghon, D.F.Klessig. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17872 (1992)
15. A.Aharoni, N.Baran, H.Manor. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 5221 (1993)
16. Y.Takata, M.Fujioka. *Biochemistry*, **31**, 4369 (1992)
17. K.Subbaramaiah, S.A.Simms. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8636 (1992)
18. C.Wenzel, W.Guschlbauer. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 4604 (1993)
19. C.Wenzel, M.Moulard, A.Løbner-Olesen, W.Guschlbauer. *FEBS Lett.*, **280**, 147 (1994)
20. C.Taylor, K.Ford, B.A.Conolly, D.P.Hornby. *Biochem. J.*, **291**, 493 (1993)
21. J.Welsh, C.R.Cantor. *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 505 (1984)
22. A.J.Varghese. *Aging Carcinogenesis Radiat. Biol.*, **207** (1976)
23. A.Havron, J.Sperling. *Biochemistry*, **16**, 5651 (1977)
24. S.Maruta, M.Burke, M.Ikebe. *Biochemistry*, **29**, 9910 (1990)

25. H. Wolfes, B.A. Fleiss, F. Winkler, A. Pingoud. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 267 (1986)
26. B. Barbier, M. Charlier, J.-C. Maurizot. *Biochemistry*, **23**, 2933 (1984)
27. R. Ogata, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4973 (1977)
28. N.C. Khanna, S. Lakhani, K.K. Tewari. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 69 (1992)
29. J.M. Gott, M.C. Willis, T.H. Koch, O.C. Uhlenbeck. *Biochemistry*, **30**, 6290 (1991)
30. E.E. Blatter, Y.W. Ebricht, R.E. Ebricht. *Nature (London)*, **359**, 650 (1992)
31. M. Katouzian-Safadi, B. Blazy, J.-I. Cremet, J.-P. Le Caer, J. Rossier, M. Charlier. *Biochemistry*, **32**, 1770 (1993)
32. M. Katouzian-Safadi, B. Laine, F. Chartier, J.-I. Cremet, D. Belaiche, P. Sautiere, M. Charlier. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 4937 (1991)
33. T.T. Nikiforov, B.A. Conolly. *Nucl. Acids Res.*, **30**, 1209 (1992)
34. Y.J.K. Farrar, R.K. Evans, C.M. Beach, M.S. Coleman. *Biochemistry*, **30**, 3075 (1991)
35. C.E. Catalano, D.J. Allen, S.J. Benkovic. *Biochemistry*, **29**, 3612 (1990)
36. S.K. Syed, S. Kim, W.K. Paik. *Biochemistry*, **32**, 2242 (1993)
37. G.A. Young, M. Woody, C.R. Vader, R.W. Woody, B.E. Haley. *Biochemistry*, **23**, 2843 (1984)
38. P. Mitchell, K. Stade, M. Osswald, R. Brimacombe. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 887 (1993)
39. N. Hori, S. Iwai, H. Inone, E. Ohtsuka. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15591 (1992)
40. R.K. Evans, J.D. Johnson, B.E. Haley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5382 (1986)
41. N.O. Reich, E.A. Everett. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8929 (1990)
42. M.A. Sypes, D.S. Gilmour. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 807 (1994)
43. J. Rinke-Appel, N. Jünke, R. Brimacombe, S. Dokudovskaya, O. Dontsova, A. Bogdanov. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2853 (1993)
44. O. Dontsova, V. Tishkov, S. Dokudovskaya, A. Bogdanov, T. Döring, J. Rinke-Appel, B. Greuer, R. Brimacombe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4125 (1994)
45. O. Dontsova, A. Kopylov, R. Brimacombe. *EMBO J.*, **10**, 2613 (1991)
46. J. Rinke-Appel, N. Jünke, R. Brimacombe, I. Lavric, S. Dokudovskaya, O. Dontsova, A. Bogdanov. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 3018 (1994)
47. O. Dontsova, S. Dokudovskaya, A. Kopylov, A. Bogdanov, J. Rinke-Appel, N. Jünke, R. Brimacombe. *EMBO J.*, **11**, 3105 (1992)
48. S.S. Dokudovskaya, O.A. Dontsova, S.L. Bogdanova, A.A. Bogdanov, R. Brimacombe. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 149 (1993)
49. Г.Г. Карпова. Дис. д-ра хим. наук. МГУ, Москва, 1990
50. C.A. Harrison, D.H. Turner, D.C. Hinkle. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 2399 (1982)
51. S.S. Sastry, H.P. Spielmann, Q.S. Hoang, A.M. Phillips, A. Sancar, J.E. Hearst. *Biochemistry*, **32**, 5526 (1993)
52. E. Gajewski, M. Dizdaroglu. *Biochemistry*, **29**, 977 (1990)
53. M. Dizdaroglu, E. Gajewski, P. Reddy, S.A. Margolis. *Biochemistry*, **28**, 3625 (1989)
54. Л. Страйер. *Биохимия*, Т.3. Мир, Москва, 1985, С.129
55. C.M. Arundel, C.M. Vines, P.J. Tofilon. *Cancer Res.*, **48**, 5669 (1988)
56. V. Jackson. *Cell*, **15**, 945 (1978)
57. G. Christiansen, J. Griffith. *Nucl. Acids Res.*, **4**, 1837 (1977)
58. K.L. Brodolin, V.M. Studitsky, A.D. Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 5748 (1993)
59. J.P. Shouten. *J. Biol. Chem.*, **260**, 9929 (1985)
60. J.D. McGhee, P.H. von Hippel. *Biochemistry*, **14**, 1281 (1975)
61. J.D. McGhee, P.H. von Hippel. *Biochemistry*, **14**, 1297 (1975)
62. M. Sugiyama, M. Costa, T. Nakagawa, T. Hidaka, R. Ogura. *Cells Cancer Res.*, **48**, 1100 (1988)
63. M.D. Cohen, C.A. Miller, L.S. Xu, E.T. Snow, M. Costa. *Anal. Biochem.*, **186**, 1 (1990)
64. J.E. Hearst. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 69 (1981)
65. J.W. Levinson, L.F. Leibes, J.J. McCormic. *Biochim. Biophys. Acta*, **447**, 260 (1976)
66. E.S. Levina, S.G. Bavykin, V.V. Shick, A.D. Mirzabekov. *Anal. Biochem.*, **110**, 93 (1981)
67. A.D. Mirzabekov, S.G. Bavykin, V.L. Karpov, O.V. Preobrazhenskaya, K.K. Evralidze, V.M. Tuneev, A.F. Melinkova, K.G. Gogvadze, A.A. Chenchick, R.S. Beabealashvili. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 503 (1982)
68. A.A. Chenchick, R.S. Beabealashvili, A.D. Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **128**, 46 (1981)
69. K.K. Ebralidze, T.R. Hebbes, A.L. Clayton, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 4734 (1993)
70. A.N. Chkheidze, G.G. Prikhod'ko, V.L. Karpov, S.K. Vassilenko, A.D. Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **336**, 340 (1993)
71. N. Nitta, O. Kuge, S. Yui, A. Tsugawa, H. Negishi, H. Hayatsu. *FEBS Lett.*, **166**, 194 (1984)
72. М.Н. Виноградова, В.Л. Друца, М.Г. Ивановская, Е.С. Громова, З.А. Шабарова. *Биохимия*, **48**, 286 (1983)
73. Е.В. Петушкова, В.М. Рисник, Н.И. Соколова, С.С. Третьякова, З.А. Шабарова. *Биохимия*, **45**, 726 (1980)
74. В.Л. Друца. Дис. канд. хим. наук. МГУ, Москва, 1978
75. V.M. Kodentsova, E.V. Petushkova, S.S. Tret'yakova, N.I. Sokolova, Z.A. Shabarova. *Biochem. Int.*, **10**, 195 (1985)
76. В.М. Коденцова. Дис. канд. биол. наук. МГУ, Москва, 1982
77. Н.И. Соколова, С.С. Третьякова. *Биоорг. химия*, **9**, 1157 (1983)
78. С.А. Кузнецова, М.Г. Ивановская, З.А. Шабарова. *Биоорг. химия*, **16**, 219 (1990)
79. З.А. Шабарова, Г.Я. Шефлян, С.А. Кузнецова, Е.А. Кубарева, О.Н. Сысоев, М.Г. Ивановская, Е.С. Громова. *Биоорг. химия*, **20**, 413 (1994)
80. А.А. Purmal, Z.A. Shabarova, R.I. Gumpert. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 3713 (1992)
81. R.H. Abeles, T.A. Alston. *J. Biol. Chem.*, **265**, 16705 (1990)
82. S. Cox, J. Harmenberg. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **25**, 17 (1992)
83. K.M. Ibanetich, D.V. Santi. In *The Expanding Role of Folates and Fluoropyrimidines in Cancer Chemotherapy*. (Eds Y. Rustum, J.J. McGuire). Plenum, New York, 1988. P. 113
84. D.A. Matthews, J.E. Villafranca, C.A. Janson, W.W. Smith, K. Welsh, S. Freer. *J. Mol. Biol.*, **214**, 937 (1990)
85. D.A. Matthews, K. Appelt, S.J. Oatley, N.H. Xuong. *J. Mol. Biol.*, **214**, 923 (1990)
86. S. Friedman. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 4543 (1986)
87. S. Som, S. Friedman. *EMBO J.*, **12**, 4297 (1993)
88. L. Chen, A.M. McMillan, W. Chang, K. Ezaz-Nikpay, W.S. Lane, G.L. Verdine. *Biochemistry*, **30**, 11018 (1991)
89. S. Friedman, N. Ansari. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 3241 (1992)
90. M.W. Wyszynski, S. Gabbara, E.A. Kubareva, E.A. Romanova, T.S. Oretskaya, E.S. Gromova, Z.A. Shabarova, A.S. Bhagwat. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 295 (1993)
91. D.S. Osterman, G.D. DePillis, J.C. Wu, A. Matsuda, D.V. Santi. *Biochemistry*, **27**, 5204 (1988)
92. T. Hanck, S. Schmidt, H.-J. Fritz. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 303 (1993)
93. X. Gu, D.V. Santi. *Biochemistry*, **31**, 10295 (1992)
94. D.V. Santi, L.W. Hardy. *Biochemistry*, **26**, 8599 (1987)
95. *Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот*. (Под ред. Ф.С. Спирина). Высшая школа, Москва, 1990
96. S.G. Morham, S. Shuman. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15984 (1992)
97. C.V. Brouillette, C.T.-C. Chang, M.P. Mertes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 613 (1979)
98. R.M. Starzyk, S.W. Koontz, P. Schimmel. *Nature (London)*, **298**, 136 (1982)
99. U. Wichser, C. Brack. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4103 (1992)
100. J. Czichos, M. Koehler, B. Reckmann, M. Renz. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 1563 (1989)
101. J.W. Hockensmith, W.L. Kubasek, W.R. Vorachek, P.H. von Hippel. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15712 (1993)
102. J.W. Hockensmith, W.L. Kubasek, E.M. Evertsz, L.D. Mesner, P.H. von Hippel. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15721 (1993)
103. M. Mirfakharaei, A.M. Weiner. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 3591 (1993)
104. С.М. Аваева. *Химия белка. Ч. I*. Множ. лаб. химич. ф-та МГУ, Москва, 1983.
105. E. Cross. *Methods Enzymol.*, **11**, 238 (1967)
106. W.A. Schroeder, J.B. Shelton, J.R. Shelton. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 551 (1969)
107. A.M. Crestfield, S. Moore, W.H. Stein. *J. Biol. Chem.*, **238**, 622 (1963)

108. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. (Ed. P.T.Matsudaira). Academic Press, New York, 1989
109. R.J.Simpson, R.L.Moritz, G.S.Begg, M.R.Rubira, E.C.Nice. *Anal. Biochem.*, **177**, 221 (1989)
110. M.W.Hunkapiler, K.Granlund-Moyer, N.W.Whiteley. In *Methods in Protein Sequence Analysis*. (Ed. J.E.Shively). Humana Press, Clifton, NJ, 1986
111. B.Juodka, M.Pfuetz, D.Werner. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 6391 (1991)
112. B.B.Baxter, M.D.Topal. *Biochemistry*, **32**, 8291 (1993)

METHODS OF COVALENT ATTACHMENT OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR DERIVATIVES TO PROTEINS

G.Ya. Sheflyan, E.A. Kubareva, E.S. Gromova

*A.N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University
M.V.Lomonosov State University, Department of Chemistry.
Vorob'evy Gory, 119899 Moscow. Fax +7(095) 939-3181*

Methods concerning the affine modification of proteins, specific to nucleic acids, by the active analogues of nucleic acids and their components are surveyed. The active groups introduced into either proteins or nucleic acids and symmetric cross-linking reagents used to obtain the covalent nucleic acid-protein conjugates are listed. Methods of nucleic acid-protein conjugate analysis are summarized as well as the identification of amino acid of protein connected with nucleic acid.

Bibliography — 112 references.

Received 13th December 1995