

11. Обратная транскриптаза из печени крыс: происхождение и вероятные функции / В. П. Томсонс, Г. Б. Пыринова, Н. П. Корохов и др. // Докл. АН СССР.— 1983.— 272, № 6.— С. 1498—1501.
12. РНК-зависимая ДНК-полимераза из печени крыс / Г. Б. Пыринова, В. П. Томсонс, Н. Н. Блинова, Р. И. Салганик // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 3.— С. 743—750.
13. Шеррер К. Выделение РНК и изучение ее свойств с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы // Методы вирусологии и молекуляр. биологии.— М.: Мир, 1972.— С. 337—354.
14. Букринский М. И., Крамеров Д. А. Особенности транскрипции генов интрацистер-нальных А-частиц // Вопросы вирусологии.— 1984.— 29, № 3.— С. 345—350.
15. Clemens M. J. Purification of eukaryotic messenger RNA // Transcription and translation, a practical approach / Eds B. D. Hames, S. J. Higgins.— Oxford; Washington: IRL press, 1984.— P. 211—230.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
17. Исследование трансляции полисомной поли-А-содержащей РНК печени крыс в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы / С. Я. Головин, В. Н. Чесноков, Н. Н. Блинова и др. // Изв. Сиб. отд-ния АН СССР.— 1981.— № 2.— С. 115—121.

Ин-т цитологии и генетики Сиб. отд-ния АН СССР,
Новосибирск
Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 03.06.86

УДК 577.323

ДИМЕРИЗАЦИЯ Ecodam-метилазы, ИНДУЦИРОВАННАЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫМ СУБСТРАТОМ

Н. И. Речкунова, В. В. Зиновьев, Э. Г. Малыгин, Ю. А. Горбунов,
С. Г. Попов, В. Ф. Нестеренко, Я. И. Бурьянов

Введение. При исследовании взаимодействия Ecodam-метилазы (К.Ф.2.1.1) с синтетическими олигонуклеотидными субстратами, содержащими различные дефекты в структуре участка узнавания, было показано, что взаимодействие фермента с субстратом происходило эффективно только в тех случаях, когда в обеих цепях участка узнавания сохранились GA-последовательности [1]. Эти данные позволили предположить, что фермент-субстратный комплекс обладает симметрией второго порядка. Поскольку известно, что Ecodam-метилаза является мономерным белком [2], и ее первичная последовательность не содержит сколько-либо значимых гомологий [3], возникло предположение, что фермент способен образовывать симметричные олигомерные структуры в присутствии субстрата. При изучении комплексообразования Ecodam-метилазы с синтетическими олигонуклеотидами в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния наилучшее соответствие между экспериментальными и расчетными данными было получено для модели, учитывающей взаимодействие двух молекул фермента с молекулой субстрата [4].

В настоящей работе методами гель-фильтрации и ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы показано увеличение молекулярной массы фермента в присутствии субстрата на величину, большую молекулярной массы субстрата.

Материалы и методы. Ecodam-метилазу выделяли, как описано в [5]. Олигонуклеотиды синтезировали по триэфирному методу [6]. Ультрацентрифугирование проводили в линейном градиенте плотности сахарозы 10—30 % [2]. Раствор сахарозы готовили в буфере А (20 мМ К-фосфат, pH 7,5, 10 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ) с добавлением NaCl и олигонуклеотидов до определенной концентрации. На градиент наставляли 0,5 нмоль Ecodam-метилазы в объеме 100 мкл. После центрифугирования градиент раскапывали на фракции по 100 мкл и определяли активность фермента в каждой фракции. Для этого отбирали аликвоты (20 мкл) и добавляли в каждую по 6 мкг ДНК спермы лосося и 60 нмоль ³H-AdoMet. Смесь инкубировали 1 ч при 37 °С, дальнейшие процедуры проводили, как описано ранее [1]. Молекулярную массу фермента определяли по методу [7]. Положение маркерных белков в градиенте после центрифугирования определяли по оптической плотности при 280 нм, измерения выполняли на микроспектрофотометре «Обь». Гель-фильтрацию проводили на колонке ($l=10$ см, $d=0,3$ см) с сефакрилом S-200 [8].

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что Ecodam-мети́лаза независимо от концентрации белка в растворе является мономером с молекулярной массой около 25 000 [5]. В присутствии S-аденозилметионина молекулярная масса фермента не изменяется [2], однако определение ее в присутствии ДНК не проводили. Мы использовали в качестве субстрата 20-членный олигонуклеотидный дуплекс 5'-CAGTTTAGGATCCATTTTCAC, в центре которого содержится участок узнавания фермента GATC. Было обнаружено, что при центрифугировании Ecodam-мети́лазы в градиенте плотности сахарозы, содержащем равномерно распределенный по объему 20-членный дуплекс, наблюдается увеличение молекулярной массы фермента по сравнению с градиентом без субстрата. По результатам центрифугирования молекулярная

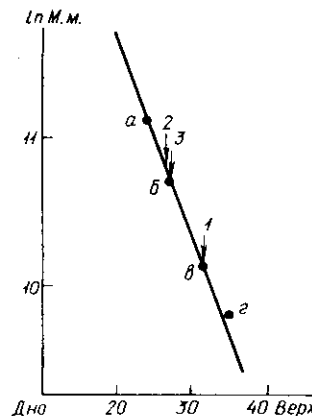
Определение молекулярной массы Ecodam-мети́лазы методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы (10–30 %): 1 — нативный фермент в 0,1 М NaCl; 2 — фермент в присутствии 1 мкМ 20-членного дуплекса; 3 — фермент в присутствии 1 мкМ 20-членного дуплекса в 0,1 М NaCl. Используемые маркерные белки: а — бычий сывороточный альбумин (68 000); б — овалбумин (45 000); в — химотрипсиноген (25 000); г — миоглобин (17 800)

Determination of the molecular weight of Ecodam-methylase by centrifugation in the sucrose density gradient (10–30 %): 1 — native enzyme in 0.1 M NaCl; 2 — enzyme in the presence of double-stranded 20-base long deoxyribooligonucleotide; 3 — enzyme in the presence of double-stranded 20-base long deoxyribooligonucleotide in 0.1 M NaCl. The used marker proteins: a — bovine serum albumin (68 000); б — ovalbumin (45 000); в — chymotrypsinogen (25 000); г — myoglobin (17 800)

масса Ecodam-мети́лазы равна 25 000 (рисунок), что соответствует литературным данным [5]. Добавление в градиент субстрата в концентрации 1 мкМ приводит к кажущемуся увеличению молекулярной массы фермента до 46 000. Следует отметить, что центрифугирование в отсутствие NaCl приводит к инактивации фермента, тогда как при добавлении субстрата активность фермента сохраняется и кажущаяся молекулярная масса его равна 51 000. Уменьшение концентрации субстрата в градиенте до 0,1 мкМ, а также использование в качестве субстрата более короткого самокомплементарного октануклеотида 5'CGGATCCG в концентрации 1 мкМ (в расчете на дуплекс) приводит к наблюдаемой молекулярной массе фермента 30 000–31 000 (данные не приведены).

При гель-фильтрации Ecodam-мети́лазы на колонке с сефакрилом S-200, уравновешенной буфером для элюции, содержащим 1 мкМ 20-членный дуплекс и 0,1 М NaCl, подвижность фермента соответствует значению молекулярной массы 46 000, что полностью совпадает с результатом, полученным методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Гель-фильтрация не позволяет установить молекулярной массы фермента в отсутствие субстрата, поскольку имеет место аномальная подвижность фермента, что, возможно, связано с повышенным сродством фермента к носителю.

Наблюдаемое увеличение молекулярной массы Ecodam-мети́лазы в присутствии субстрата на величину, большую молекулярной массы субстрата (~14 000), можно объяснить, учитывая равновесие между димерной формой фермента, связанного с субстратом (E₂S), и свободным ферментом (E). Значение молекулярной массы комплекса определяется соотношением количества фермента, находящегося в комплексе, и свободного фермента. Таким образом, полученные результаты не противоречат возможности образования димерной формы фермента и согласуются с ранее полученными данными по исследованию взаимодействия Ecodam-мети́лазы с олигонуклеотидными субстратами методом малоуглового рентгеновского рассеяния [4].



DIMERIZATION OF ECODAM-METHYLASE INDUCED BY THE OLIGONUCLEOTIDE SUBSTRATE

N. I. Rechkunova, V. V. Zinoviev, E. G. Malygin, Yu. A. Gorbunov, S. G. Popov, V. F. Nesterenko, Ya. I. Buriyanov

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region
Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

The Ecodam-methylase has been investigated for its interaction with the 20-base oligonucleotide duplex containing the enzyme recognition site. An increase of the enzyme molecular weight was detected by the gel-filtration and sucrose density gradient centrifugation methods. The maximal value of the molecular complex weight was observed when concentrations of the enzyme and the substrate were equal. The results obtained prove the formation of the dimeric enzyme form in the substrate presence.

1. Действие ДНК-метилазы Ecodam на одностранные последовательности и синтетические олигонуклеотиды / В. В. Зинovieв, Ю. А. Горбунов, С. Г. Попов и др. // Молекуляр. биология.— 1985.—19, № 4.— С. 947—953.
2. Herman G. E., Modrich P. Escherichia coli dam methylase. Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme // J. Biol. Chem.— 1982.—257, N 5.— P. 2605—2612.
3. Brooks J. E., Blumenthal E. M., Gingeras T. R. The isolation and characterization of the Escherichia coli DNA adenine methylase (dam) gene // Nucl. Acids Res.— 1983.—11, N 3.— P. 837—851.
4. Исследование стехиометрии комплексов при взаимодействии Ecodam-метилазы с субстратами методом малоуглового рентгеновского рассеяния / В. В. Зинovieв, Ф. В. Тузиков, Э. Г. Малыгин и др. // Конформационные изменения биополимеров в растворах: Материалы VI симпозиума. (Тбилиси, 20—22 ноября 1985 г.)— Тбилиси, 1985.— С. 56.
5. Бурьянов Я. И., Захарченко В. Н., Баев А. А. Выделение, очистка и некоторые свойства адениновой ДНК-метилазы Ecodam // Докл. АН СССР.— 1981.—259, № 6.— С. 1492—1495.
6. Hirose T., Grea R., Itakura K. Rapid synthesis of triphosphorylated nucleotide blocks // Tetrahedron Lett.— 1978.— N 28.— P. 2449—2452.
7. Martin R. G., Ames B. N. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures // J. Biol. Chem.— 1961.—236, N 5.— P. 1372—1379.
8. Siegel L. M., Monty K. G. Determination of molecular weights and fractional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation // Biochim. et biophys. acta.— 1966.—112, N 2.— P. 346—362.

ВНИИ молекуляр. биологии, Кольцово Новосибир. обл.

Получено 10.09.86

Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
Пушино Москов. обл.

УДК 576.315.42+577.175.642

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ АДФ-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ В ХРОМАТИНЕ МОЗГА КРОЛИКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА

Г. А. Паносян, Э. Г. Саркисян, Э. С. Геворкян, Л. В. Карабашян

Известно, что ряд внутриядерных процессов зависит от степени АДФ-рибозилирования ядерных белков [1—3]. Несмотря на возрастающий интерес исследователей к этой посттрансляционной модификации белков, ее роль в осуществлении основных функций ядра остается неясной. Идентификация АДФ-рибозилированных белков, определение уровня их модификации при различных функциональных состояниях клетки является необходимым для понимания физиологического значения этого процесса. Изменение степени АДФ-рибозилирования ядерных белков может сказаться на суперструктуре хроматина и привести к изменению уровня его транскрибируемости. В этом аспекте возможная взаимосвязь между уровнем АДФ-рибозилирования белков хроматина и процессом гормональной активации генома представляется весьма вероятной.