

Preparatyka ^{13}C - i ^{15}N - znakowanych RNA do badań strukturalnych metodami heterojądrowego, wielokierunkowego magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

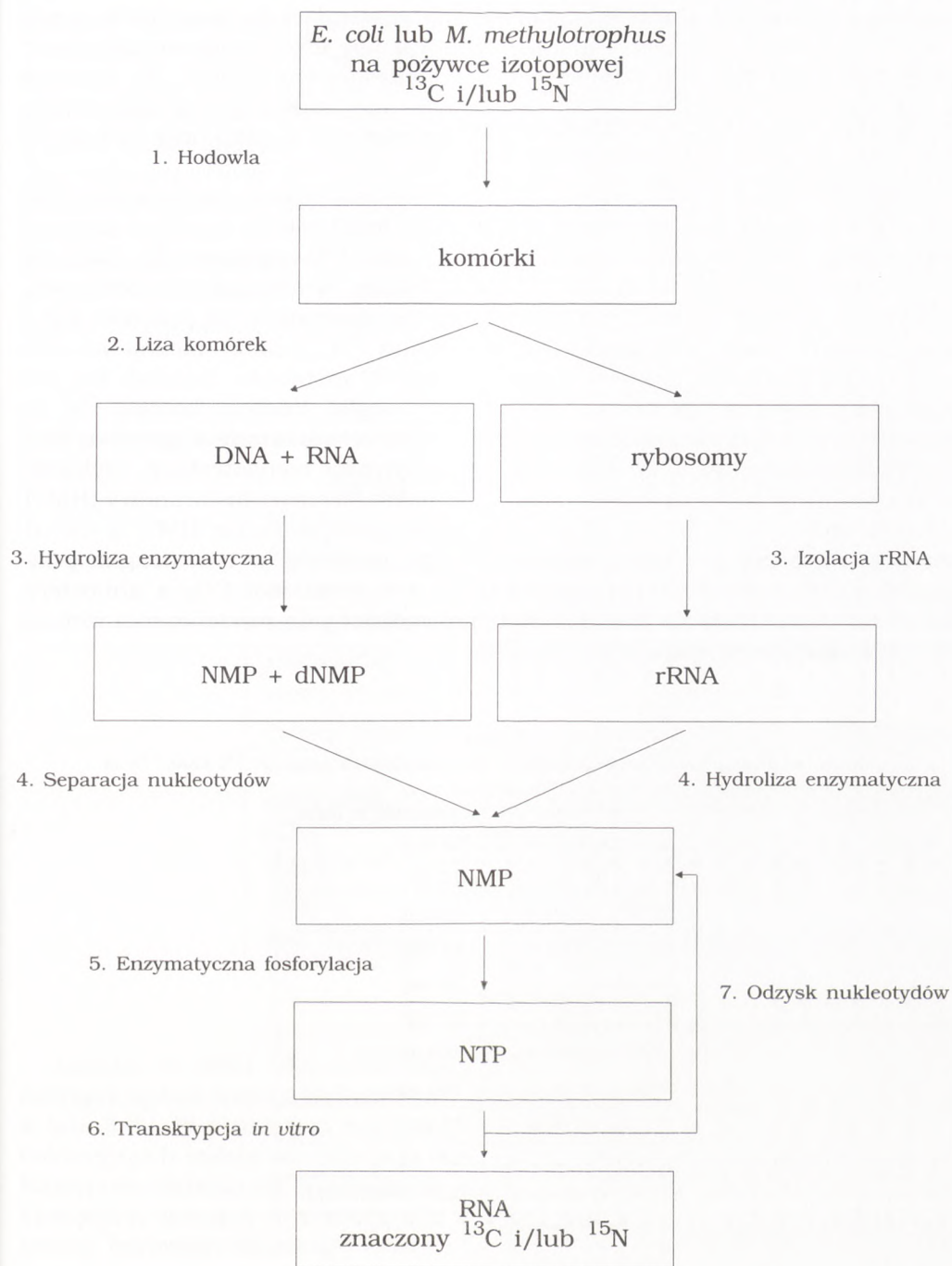
Mikołaj Olejniczak
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk
Poznań

Do najważniejszych metod badania struktur makrocząsteczek biologicznych należą: 1) analiza rentgenowska ich monokryształów i 2) badania w roztworach za pomocą heterojądrowych, wielokierunkowych technik magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Obecnie powiązanie metod heterojądrowego, wielokierunkowego NMR oraz technik znakowania izotopowego (^{13}C i ^{15}N) białek za pomocą metod inżynierii genetycznej umożliwia określenie struktury w roztworze dla białek, których ciężary cząsteczkowe (dla monomeru) sięgają 25kD (1). Izotopy ^{13}C i ^{15}N są nieradioaktywnymi, występującymi w śladowych ilościach pierwiastkami, których jądra cechują właściwości magnetyczne umożliwiające ich łatwą detekcję stosując metody NMR.

W przypadku badań strukturalnych RNA, dla których pozyskiwanie monokryształów jest bardzo trudne, alternatywne zastosowanie metod NMR napotyka wiele przeszkód. Część z nich związana jest z charakterystycznymi właściwościami strukturalnymi RNA (2) sprawiającymi, że sygnały protonów H3', H4' i H5'/H5'' rybozy stłoczone są w przedziale 1ppm. Dla pełnej interpretacji widm i rozwiązania struktur RNA rzędu 20 jednostek nukleotydowych stało się konieczne wprowadzenie wielokierunkowych technik ^1H , ^{13}C i ^{15}N NMR opartych na pełnym lub selektywnym ^{13}C - i ^{15}N -znakowaniu cząsteczek (3,4). Selektywne ^{13}C - i ^{15}N -znakowanie wybranych atomów węgla i azotu w cząsteczce RNA może być oparte jedynie na metodach chemicznych, które nie są przedmiotem tego artykułu. Przygotowanie w pełni ^{13}C - i ^{15}N -znakowanych (*uniformly labelled*) preparatów, a zatem takich w których wszystkie atomy węgla i azotu są zastąpione izotopami ^{13}C i ^{15}N wymaga zastosowania drogich i pracochłonnych procedur biosyntetycznych (5-7).

Procedura otrzymywania w pełni ^{13}C - i ^{15}N -znakowanych RNA składa się z kilku podstawowych etapów przedstawionych schematycznie na rys.1. Naj-



Rys. 1. Etapy procedury otrzymywania ^{13}C - i/lub ^{15}N -znakowanego RNA z uwzględnieniem alternatywnych metod pozyskiwania NMP z komórek bakteryjnych.

pierw z bakterii hodowanych na pożywkach zawierających, jako źródła węgla i azotu wyłącznie izotopy ^{13}C i/lub ^{15}N , izoluje się RNA, który zostaje następnie hydrolizowany do nukleozydo-5'-monofosforanów (NMP). W procesie enzymatycznej fosforylacji NMP otrzymuje się nukleozydo-5'-trifosforany (NTP). Wykorzystywane są one w reakcji transkrypcji *in vitro* przy udziale T7 RNA polimerazy i matryc DNA.

Najprostszą metodą otrzymywania biomasy bakteryjnej, zawierającej RNA w pełni wyznakowane izotopami ^{13}C i/lub ^{15}N , jest hodowla *E. coli* na pożywce minimalnej zawierającej ^{13}C -glukozę i/lub sole ^{15}N -amonowe (5). Bakterie z tego gatunku hoduje się na pożywce płynnej, w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C , po czym oddziela się je wirowaniem od pożywki, tab. 1 (5). Dla uniknięcia wysokich kosztów zakupu ^{13}C -glukozy można na tym etapie wykorzystywać bakterie hodowane na ^{13}C -metanolu. Związek ten jest najtańszym (w przeliczeniu na mol atomów węgla) źródłem izotopu ^{13}C do znakowania nukleotydów. Zastosowano w tym celu bakterie z gatunku *Methylophilus methylotrophus*, które są bezwzględnie metylotrofami, wykorzystującymi do przyswajania metanolu szlak heksulozomonofosforanowy (HMP). Zdecydowano się na wybór metylotrofa wykorzystującego tor HMP, a nie alternatywny, serynowy szlak asymilacji węgla ponieważ w tym drugim przypadku na dwa mole CH_3OH przyswajany jest jeden mol CO_2 z atmosfery. Zjawisko to jest niepożądane ponieważ prowadziłoby do rozcieńczenia izotopu ^{13}C w bakteryjnym RNA.

TABELA 1

SKŁAD POŻYWKI *E. COLI* HODOWANEJ NA PODŁOŻU ZAWIERAJĄCYM IZOTOPY ^{13}C ORAZ ^{15}N (5)

Składnik	Zawartość w litrze
KH_2PO_4	13,6 g
$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,3 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	15 mg
Na_2EDTA	30 mg
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	240 μg
$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	180 μg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27 μg
CoCl_2	270 μg
98% ^{13}C -glukoza	0,1% (wag./obj.)

Stosując *M. methylotrophus*, w przeliczeniu na ilość wykorzystanego izotopu, uzyskuje się o 58% mniej NMP niż w przypadku *E. coli*, ale koszt

zakupu ^{13}C -metanolu jest siedmiokrotnie niższy niż dla odpowiedniej ilości ^{13}C -glukozy. Natomiast, wydajność wbudowywania ^{15}N przez *M. methylotrophus* do zasad azotowych jest znacznie niższa i wynosi 0,058% AMP i 0,085% GMP, podczas gdy z *E. coli* otrzymuje się 0,87% AMP i 1,07% GMP, a z *B. subtilis* 1,68% inozyny i 5,14% guanozyny w stosunku do ilości wykorzystanego izotopu ^{15}N (8). *M. methylotrophus* szybko rośnie na pożywkach zawierających minimalny zestaw soli mineralnych i metanol (czas podwojenia liczby komórek wynosi ok. 2 godz.). Hodowlę prowadzi się na pożywce płynnej, w warunkach tlenowych, w temp. 37°C , tab. 2 (5). Aby zapewnić, jak najpełniejsze wykorzystanie ^{13}C -metanolu komórki oddziela się od pożywki na początku stacjonarnej fazy wzrostu hodowli.

TABELA 2

SKŁAD POŻYWKI BAKTERII *M. METHYLOTROPHUS* HODOWANEJ NA PODŁOŻU ZAWIERAJĄCYM ^{13}C -METANOL (5)

Składnik	Zawartość w litrze
KH_2PO_4	0,95 g
NaH_2PO_4	0,78 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,8 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	50 μg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	50 μg
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,3 mg
CoCl_2	10 μg
H_3BO_3	7 μg
NaMoO_4	10 μg
99% ^{13}C -metanol	1ml

Isolując w pełni ^{13}C - i ^{15}N -znakowane RNA z komórek *E. coli*, jak i *M. methylotrophus* można wykorzystać procedurę przedstawioną schematycznie w tab. 3 (5). W pierwszym etapie tej metody z rozbitych detergentem komórek bakteryjnych izoluje się całą pulę kwasów nukleinowych i trawi nukleazą P1. Następnie oddziela się 5'-rybonukleotydy od niepożądanych 5'-deoksyrybonukleotydów, stosując chromatografię na kolumnach zmodyfikowanych resztami kwasu borowego wiążącego reszty cis-diolowe rybonukleotydów.

TABELA 3
GŁÓWNE ETAPY IZOLACJI NMP Z KOMÓREK BAKTERYJNYCH (5)

Etapy izolacji
liza komórek 0,5% SDS w buforze STE (0,1 M NaCl, 10 mM Tris·Cl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)), w 37°C
ekstrakcja białek mieszaniną: fenol, chloroform, alkohol izoamylowy w stosunku 25:24:1
wytrącenie kwasów nukleinowych przez inkubację z jedną objętością izopropanolu z octanem sodu (w stosunku 11:1) przez noc, w temp. -20°C
trawienie kwasów nukleinowych (DNA+RNA) nukleazą P1. Całkowitą hydrolizę do NMP i dNMP potwierdzono HPLC
separacja rybonukleotydów przy użyciu chromatografii powinowactwa do reszt kwasu borowego

Dla pozyskania znakowanego RNA z komórek *E. coli* można wykorzystać też inną metodę. Opiera się ona na izolacji tylko rybosomalnego RNA i jego enzymatycznej hydrolizie. O wyborze rRNA, jako źródła NMP zdecydowało to, że zawiera on najmniej zmodyfikowanych nukleotydów spośród komórkowych RNA, stanowiąc jednocześnie 80% kwasu rybonukleinowego w komórkach *E. coli*. Najważniejsze etapy tej procedury izolacyjnej są przedstawione w tab. 4 (6).

TABELA 4
GŁÓWNE ETAPY IZOLACJI NMP Z KOMÓREK BAKTERYJNYCH (6)

Etapy izolacji
rozbicie komórek prasa
hydroliza kwasu deoksyrybonukleinowego DNazą 1
izolacja wirowaniem frakcji rybosomalnej
ekstrakcja białek mieszaniną: fenol, chloroform, alkohol izoamylowy w stosunku 25:24:1
wytrącenie rRNA potrójną objętością etanolu, przez noc, w temp. -20°C
hydroliza rRNA do NMP przy użyciu nukleazy P1

Jeżeli w RNA, które zamierzamy otrzymać tylko niektóre typy nukleotydów mają być wyznakowane konieczne jest rozdzielenie otrzymanych UMP, AMP, GMP i CMP. Reakcja enzymatycznej fosforylacji każdego NMP jest wtedy prowadzona osobno; gdy syntezowany RNA ma być złożony z wszystkich czterech ¹³C- i ¹⁵N-znakowanych nukleotydów reakcję fosforylacji prowadzi się w jednej mieszaninie reakcyjnej.

Ostatnio zaproponowano (8) alternatywną drogę uzyskiwania ¹⁵N-znakowanych nukleotydów purynowych, które mogą być po fosforylacji wykorzystywane w syntezie RNA. W tym celu wykorzystuje się szczep *B. subtilis* wydzielający do pożywki duże ilości guanozyny i inozyny. Inozyna może być następnie przekształcona chemicznie do adenozyny. Źródłem ¹⁵N w pożywce jest ¹⁵N-mocznik i (¹⁵NH₄)₂SO₄.

Enzymatyczne przekształcenie NMP do NTP w procedurze ^{13}C - i ^{15}N -znakowania RNA zostało opisane przez Williamsona i wsp. (5). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi m. in. AMP, UMP, CMP, GMP i 3-fosfoglicerynian (3-PG). Reakcję inicjuje się dodaniem fosfogliceromutazy, kinazy adenylanowej (AK), enolazy, i kinazy pirogronianowej (PK). Na tym etapie dochodzi do całkowitego przekształcenia AMP w ATP i częściowego CMP w CTP. Przebieg reakcji monitoruje się, np. przy użyciu HPLC. Po zamianie > 90% puli AMP w ATP do reakcji dodaje się kinazę guanylanową (GK) i kinazę nukleozydomonofosforanów (NMPK). Powstały uprzednio ATP zostaje teraz użyty w reakcji fosforylacji pozostałych NMP do NTP.

W trakcie reakcji 3-PG przy udziale fosfogliceromutazy i enolazy zostaje przekształcony do fosfoenolopirogronianu (PEP), alternatywnie do mieszaniny reakcyjnej można bezpośrednio dodać PEP, ale jest on drogi w porównaniu z odczynnikami potrzebnymi do jego syntezy *in situ*. AK, GK i NMPK przekształcają NMP do nukleozydo-5'-difosforanów (NDP), przenosząc na nie resztę ortofosforanu z ATP. Następnie NDP ulegają fosforylacji do NTP przy wykorzystaniu PK, która katalizuje reakcję przeniesienia ortofosforanu z PEP na NDP z wytworzeniem odpowiednich NTP i pirogronianu. Przed użyciem otrzymanych NTP w reakcji transkrypcji *in vitro* należy usunąć z ich roztworu sole i zanieczyszczenia o wysokiej masie cząsteczkowej. Można w tym celu stosować chromatografię powinowactwa cis-diolowego.

Syntezę RNA prowadzi się przy użyciu T7 RNA polimerazy z wykorzystaniem syntetycznych (9) lub plazmidowych matryc DNA w warunkach opisanych w tab. 5 (5). Po zakończeniu reakcji konieczne jest odseparowanie za pomocą metody preparatywnej elektroforezy właściwego transkryptu od, często występujących w przewodzie, produktów ubocznych. Po oddzieleniu właściwego RNA pozostałe cząsteczki kwasu rybonukleinowego hydrolizuje się enzymatycznie odzyskując w ten sposób, w postaci ^{13}C - i ^{15}N -znakowanych NMP, 45-50% nukleotydów użytych w reakcji transkrypcji.

TABELA 5
SYNTEZA RNA *IN VITRO*. SKŁAD MIESZANINY TRANSKRYPCYJNEJ (5)

Składnik	Stężenie
Tris·HCl (pH 8,1)	40 mM
spermidyna	1 mM
DTT	5 mM
MgCl ₂	9,6 mM
Triton X-100	0,01%
glikol polietylenowy (8000)	80 mg/ml
NTP	6,0 mM (~1,5 mM każdy)
DNA -nić „górna” i „dolna”	200 nM każda
T7 RNA polimeraza	wg optimum

Dotychczas ^{13}C - i ^{15}N -znakowane RNA zostały wykorzystane do analizy strukturalnej stosując metody heterojądrowego, wielokierunkowego NMR takich cząsteczek jak: element TAR RNA wirusa HIV-1 (5,7), wzajemnie komplementarny dupleks GGCGCUUGCGUC (6), ^{13}C -znakowany rybozym (10).

Literatura

1. Clore J. M., Gronenborn A., (1994), *Prot. Sci.*, 3, 372-390.
2. Varani G, Tinoco I., Jr., (1991), *Quar. Rev. Biophys.*, 24, 479-510.
3. Nikonowicz E. P., Pardi A., (1992), *Nature*, 355, 184-186.
4. Dieckmann T., Feigun J., (1994), *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 745-749
5. Batey R. T., Inada M., Kujawinski E., Puglisi J. D., Williamson J. R., (1992), *Nucleic Acids Res.*, 20, 4515-4523.
6. Nikonowicz E. P., Sirr A., Legault P., Jucker F. M., Baer L. M., Pardi A., (1992), *Nucleic Acid Res.*, 20, 4507-4513.
7. Michnicka M. J., Harper J. W., King J. C., (1993), *Biochemistry*, 32, 395-403.
8. Niemicka A. C., Meyer M., Engeloch T., Botta O., Hadener A., Strazewski P., (1995), *Helv. Chim. Acta.*, 78, 421-439.
9. Wyatt J. R., Chastain M., Puglisi J. D., (1991), *Biotechniques*, 11, 764-769.
10. Legault P., Farmer II B. T., Muller L., Pardi A., (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 2203-2204.

Preparation of ^{13}C - and ^{15}N -labelled RNA for the structural study using multi-dimensional, heteronuclear magnetic resonance techniques

Summary

Techniques for the preparation of ^{13}C - and ^{15}N -labelled RNA have been recently introduced, making the application of multidimensional, heteronuclear NMR techniques for the study of RNA structure in solution possible. The article briefly presents ways of RNA isolation from isotopically labelled bacteria and its subsequent degradation to ^{13}C - and ^{15}N -labelled nucleoside 5'-monophosphates then enzymatically converted to NTPs.

^{13}C - and ^{15}N -labelling of RNA is achieved by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase using isotopically labelled nucleoside 5'-triphosphates as substrates and DNA template.

Key words:

^{13}C -, ^{15}N -labelled RNA, RNA synthesis *in vitro*, heteronuclear NMR, RNA structure.

Adres do korespondencji:

Mikołaj Olejniczak, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań; fax: (061) 52 05 32.