



УДК 577.152.277.6.01

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДНК-ЗАВИСИМОЙ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ИЗ *ESCHERICHIA COLI*
И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫХ СУБЪЕДИНИЦ

Дешко Т. Н., Куделина И. А., Сурин А. М.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Методами КД- и УФ-спектроскопии изучено конформационное состояние кор- и холоферментов ДНК-зависимой РНК-полимеразы и ее α - и β -субъединиц при различных температурах, рН и концентрациях растворов. Установлено, что кор- и холофермент содержат больше регулярных структур, чем отдельные субъединицы. Методами КД и флуоресценции исследовано образование комплексов антибиотика рифамицина SV и его производного — рифампицина — с чувствительной и устойчивой к действию этих антибиотиков РНК-полимеразами, выделенными соответственно из дикого и мутантного (Rpo B255) штаммов *E. coli*. Показано, что этот процесс сопровождается изменением конформации антибиотиков и локальными структурными перестройками белка вблизи участка связывания, который включает в себя по крайней мере один остаток триптофана, расположенный в гидрофобном окружении.

ДНК-зависимая РНК-полимераза из *E. coli* осуществляет синтез всех видов клеточной РНК. Синтез полинуклеотидной цепи — сложный процесс, сопряженный со структурными перестройками в этом субъединичном ферменте [1]. Известны две энзиматически активные формы РНК-полимеразы: кор- и холофермент. Холофермент включает в себя две α -субъединицы, по одной β - и β' -субъединице и фактор инициации σ . В кор-ферменте отсутствует σ -фактор, вследствие чего он не способен специфично связываться с промотором.

Одним из наиболее эффективных инструментов структурно-функциональных исследований фермента служат антибиотики, которые специфически блокируют процесс инициации или элонгации при синтезе РНК [2]. Наибольшей популярностью пользуются рифамицины, обладающие высокой биологической активностью [3]. Известно довольно большое число мутантных штаммов *E. coli*, резистентных к действию этого антибиотика, причем все мутации локализованы в β - или β' -субъединицах [4]. В частности, недавно было установлено, что РНК-полимераза из штамма Rpo B255 отличается от фермента из дикого штамма единственной заменой — в положении 516 β -субъединицы вместо остатка аспарагиновой кислоты присутствует остаток валина [5].

Данная работа посвящена изучению конформационного состояния ДНК-зависимой РНК-полимеразы и отдельных ее субъединиц в растворе и является продолжением предыдущих исследований вторичной структуры этого фермента [6]. Кроме того, в работе представлены результаты исследования взаимодействия антибиотиков — рифампицина и рифамицина SV — с полимеразами, выделенными из дикого штамма *E. coli* и штамма Rpo B255.

В спектрах КД ДНК-зависимой РНК-полимеразы, ее α - и β -субъединиц и кор-фермента в далекой УФ-области присутствуют три основные полосы (рис. 1—4). Длинноволновая полоса при 217 нм, имеющая отрицательную эллиптичность, относится к $\pi^* \leftarrow n$ -переходу амидного хромофора, а две коротковолновые (отрицательная при 208 нм и положительная при 193 нм) отвечают расщепленному $\pi^* \leftarrow \pi$ -переходу этого же хромофора. Содержание различных структур в белке оценивали по методу Чена — Янга [7] с использованием реперных спектров и программы расчета, приведенных в работах [8—10] (таблица).

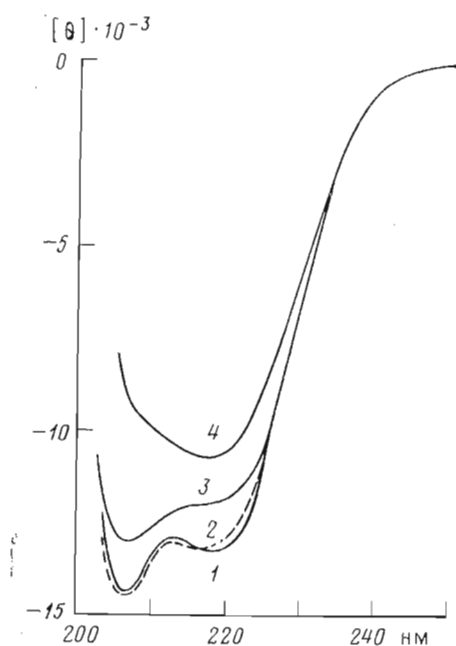


Рис. 1

Рис. 1. Спектры КД РНК-полимеразы при 20 (1, 2), 37 (3) и 60° С (4) и концентрациях 10^{-6} (1, 3, 4) и 10^{-5} М (2)

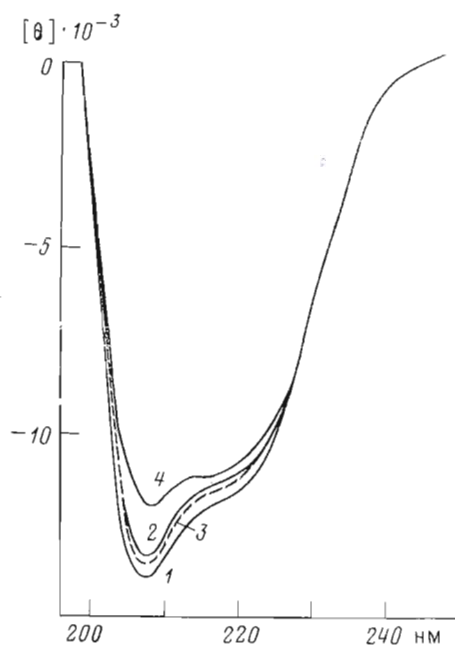


Рис. 2

Рис. 2. Спектры КД кор-фермента при 4 (1), 20 (2, 3) и 37° С (4) и концентрациях 10^{-6} (1, 2, 4) и 10^{-5} М (3)

Из полученных данных видно, что мутация (замена остатка 516 в β -субъединице) практически не влияет на вторичную структуру холофермента. Отличительной чертой кор- и холоферментов является более высокое содержание регулярных структур по сравнению с отдельными α - и β -субъединицами. Это может быть обусловлено не только более высоким содержанием упорядоченных структур в β' - и σ -субъединицах [11], но и ассоциацией субъединиц. В пользу такого предположения свидетельствует следующее наблюдение: увеличение концентрации α -субъединицы от 0,4 до 1,5 мг/мл приводит к почти двукратному росту амплитуды спектра КД в области 200–250 нм (рис. 3), т. е. α -субъединица склонна к агрегации, сопровождающейся конформационными перестройками. В случае β -субъ-

Относительное содержание различных типов вторичных структур в РНК-полимеразе, ее α - и β -субъединицах, кор-ферменте и в комплексах РНК-полимеразы с антибиотиками *

Белок	α -Спираль	β -Структура		β -Изгиб	Неупорядоченная
		антипараллельная	параллельная		
РНК-полимераза из дикого штамма **	0,35 0,31	0,12 0,09	0,00 0,10	0,14 0,17	0,39 0,33
α -Субъединица	0,15	0,07	0,04	0,15	0,58
β -Субъединица	0,28	0,11	0,03	0,16	0,42
Кор-фермент	0,36	0,12	0,00	0,17	0,35
Комплексы РНК-полимеразы с рифамицином и рифамицином SV **	0,35 0,31	0,16 0,09	0,00 0,10	0,13 0,17	0,35 0,33
	РНК-полимераза из штамма Rpo B255	0,32	0,12	0,00	0,14

* Для расчета использованы спектры КД белков в 0,01 М трис-НСl-буфере (рН 7,8), содержащем 1 мМ EDTA и 6,1 мМ дитиотреит; температура растворов 20° С.

** В верхней строке приведены данные для 20° С, а в нижней — для 60° С.

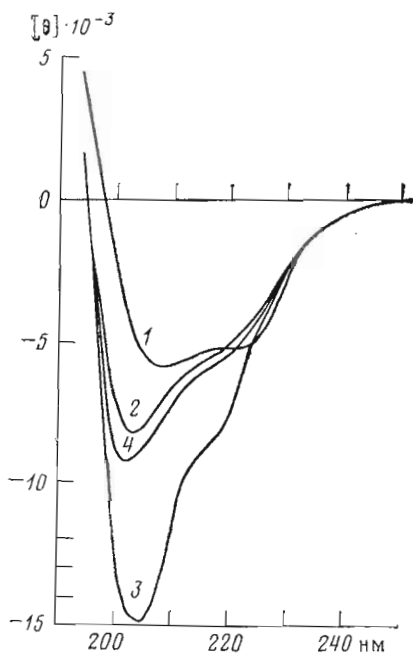


Рис. 3

Рис. 3. Спектры КД α -субъединицы РНК-полимеразы при рН 3 (1), 8 (2, 3) и 11 (4) и концентрациях 0,4 (1, 2, 4) и 1,5 мг/мл (3)

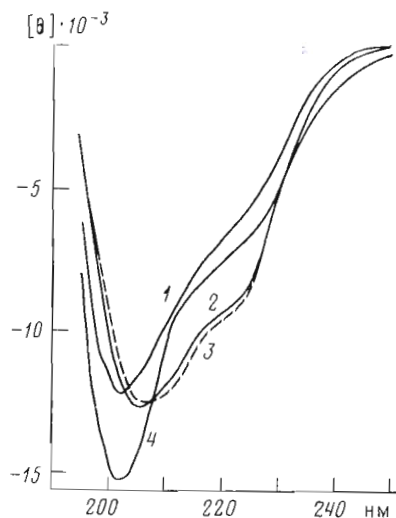


Рис. 4

Рис. 4. Спектры КД β -субъединицы РНК-полимеразы при рН 2,0 (1), 8,0 (2, 3) и 10,2 (4) и концентрациях 10^{-6} (1, 2, 4) и 10^{-5} М (3)

единицы, а также кор- и холоферментов такой концентрационной зависимости не обнаружено (рис. 1, 2, 4). Кроме того, о конформационной подвижности как α -, так и β -субъединицы свидетельствует заметное влияние рН на спектры КД этих белков (рис. 3, 4).

С ростом рН в дифференциальном спектре поглощения холофермента возникают полосы при 295 и 243 нм, указывающие на депротонирование остатков тирозина [12]. При рН 12, судя по амплитуде этих полос ($2 \cdot 10^5$ и $1,06 \cdot 10^6$ М $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$), ионизируется 91 из 94 имеющихся в молекуле холофермента остатков тирозина. Число остатков тирозина и триптофана, расположенных на поверхности белковой глобулы, оценивали также методом дифференциальной пертурбационной спектроскопии [12]. Возникающий при добавлении этиленгликоля дифференциальный УФ-спектр (рис. 5) наилучшим образом описывается суммой спектров тирозина и триптофана, если принять, что в холоферменте имеется 63 поверхностных остатка тирозина и 10 доступных пертурбанту остатков триптофана (всего в молекуле холофермента 19 остатков триптофана). Для сопоставления на рис. 5 приведена первая производная УФ-спектра холофермента, моделирующая дифференциальный спектр ароматических остатков, который наблюдался бы в том случае, если бы все эти остатки были поверхностными. Тот факт, что число ионизирующихся при рН 12 остатков тирозина заметно превышает число остатков, доступных пертурбанту в нейтральной среде, указывает, по-видимому, на денатурацию фермента при высоких значениях рН.

В спектре флуоресценции холофермента присутствует полоса с максимумом при 332 нм, имеющая полуширину 51–52 нм. Это говорит о наличии в белке остатков триптофана, расположенных как на поверхности белковой глобулы, так и в гидрофобном окружении, причем последние вносят основной вклад в суммарное излучение белка [13]. Таким образом, данные флуоресценции и пертурбационной УФ-спектроскопии свидетельствуют о гетерогенности окружения остатков триптофана.

Добавление рифампицина или рифамицина SV к РНК-полимеразе практически не влияет ни на ее спектр КД в области 190–250 нм, ни на пер-

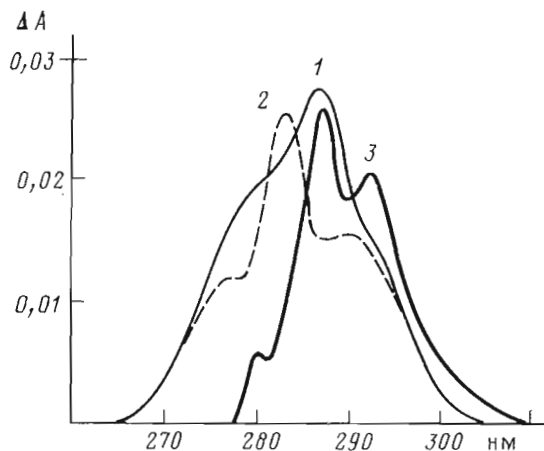


Рис. 5. Дифференциальные спектры, возникающие при пертурбации 20% этиленгликолем РНК-полимеразы (1) и смеси тирозин — триптофан, 63 : 10 (2), и первая производная спектра поглощения РНК-полимеразы (3). Концентрации белка и указанной смеси равны $4 \cdot 10^{-6}$ М

турбационный УФ-спектр. Более того, с ростом температуры конформации РНК-полимеразы и ее комплексов с антибиотиками меняются одинаковым образом (таблица). Отсюда можно заключить, что если связывание антибиотика в холоферменте и сопровождается структурными перестройками, то они носят локальный характер и затрагивают только антибиотик и его непосредственное окружение. Для проверки этого предположения были предприняты более подробные спектральные исследования рифампицина и рифамицина SV и их комплексов с РНК-полимеразой.

В спектрах поглощения рифампицина и рифамицина SV присутствуют полосы при 220–260, 315–335 и 450–475 нм, которые отвечают $\pi \leftarrow \pi$ -переходам основной хромофорной группировки, имеющей ароматический характер (рис. 6). Батохромный сдвиг максимумов полос поглощения рифампицина по сравнению с рифамицином SV обусловлен, по-видимому, влиянием заместителя при $C_{(3)}$ на электронное состояние хромофора. В спектрах КД этот эффект обнаруживается не только по батохромному сдвигу полос, но и по изменению знака полосы при 300–320 нм (рис. 7). Сопоставление спектров КД, снятых при различных температурах, а также в разных по полярности растворителях, позволяет сделать вывод о конформационной подвижности молекул антибиотиков.

Связывание антибиотиков РНК-полимеразой приводит к изменению их конформации, которое выражается в увеличении интенсивности отрицательной полосы рифамицина SV в области 400–500 нм, появлении подобной полосы в случае рифампицина, а также в двукратном увеличении амплитуды полосы при 310–340 нм (рис. 7). Судя по спектрам КД, конформации антибиотиков в комплексах с РНК-полимеразой подобны конформации рифамицина SV при низкой температуре. Известно, что ароматическая часть антибиотика выступает над поверхностью белка [14], тогда как апса-цель простирается на 14–19 Å в глубь молекулы фермента [15]. Поэтому наблюдаемые при комплексообразовании изменения спектров КД антибиотиков связаны, вероятно, с изменением хиральности апса-цепи.

Ву и сотр. [16] обнаружили, что добавление рифамицина к РНК-полимеразе приводит к тушению флуоресценции остатков триптофана, и воспользовались этим эффектом для определения константы диссоциации комплекса антибиотик — полимеразы. Тушение может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, эффективное перекрывание полос флуоресценции полимеразы и поглощения антибиотика благоприятствует безызлучательному диполь-дипольному переносу энергии с остатков триптофана на хромофор антибиотика [17]. Если принять, что квантовые выходы флуоресценции всех остатков триптофана одинаковы и равны кван-

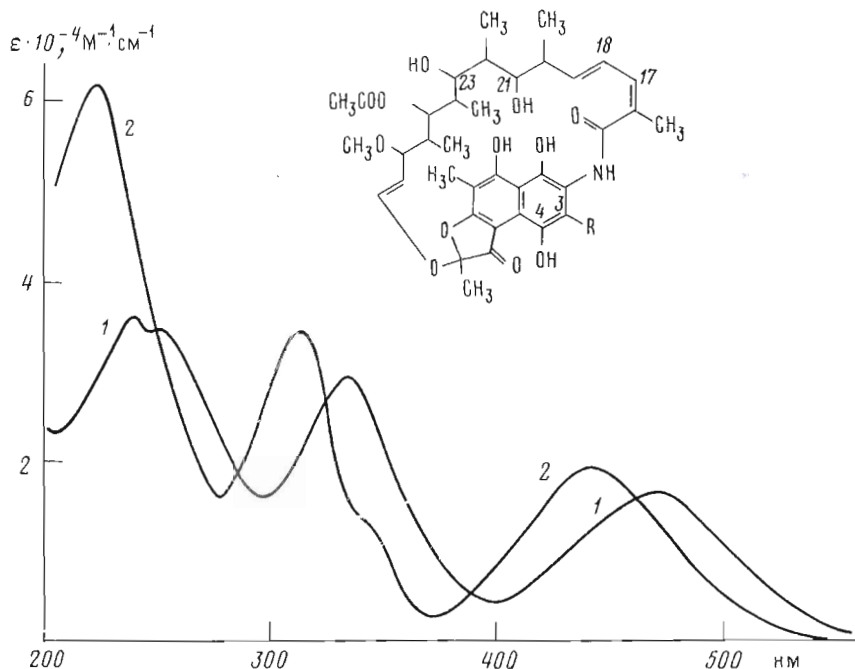


Рис. 6. Спектры поглощения рифампицина (1, R=H) и рифамицина SV (2, R= $-\text{CH}=\text{N}-\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{N}-\text{CH}_3$) в этаноле

товому выходу флуоресценции холофермента (0,16), а фактор ориентации равен $\frac{2}{3}$, то критический радиус переноса энергии составляет 39 Å. Отсюда следует, что рифампицин может тушить флуоресценцию даже тех остатков триптофана, которые не находятся в контакте с антибиотиком. Вторая причина тушения может заключаться в том, что связывание рифампицина индуцирует локальные структурные перестройки в центре связывания антибиотика, которые в свою очередь приводят к дополнительному тушению флуоресценции. Такое объяснение предполагает наличие остатка (или остатков) триптофана, расположенного в участке связывания.

Сопоставление данных о влиянии эффекта антибиотика на флуоресценцию полимераз из дикого и мутантного штаммов позволяет уточнить причину тушения. Взаимодействие рифампицина с холоферментом из дикого штамма приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции белка на 20% (ср. [19]), тогда как при титровании антибиотиком полимеразы из штамма Ppo B255 флуоресценция падает на 10–12%. Как упоминалось выше, мутантная полимераза отличается от обычной единственной заменой — остаток аспаргиновой кислоты 516 в β -субъединице замещен на остаток валина [5]. Трудно представить, что такая замена могла изменить расположение остатков триптофана во всем холоферменте настолько, что при связывании антибиотика тушение снизилось почти вдвое. Более того, идентичность спектров флуоресценции полимеразы дикого и мутантного штаммов говорит об одинаковом характере окружения остатков триптофана в этих белках. Если исходить из этих положений, то тушение флуоресценции за счет переноса энергии должно быть одинаковым для обоих типов полимераз. Следовательно, различное влияние антибиотика на флуоресценцию этих ферментов обусловлено тем, что их комплексы различаются микроокружением по крайней мере одного остатка триптофана, участвующего в формировании центра связывания антибиотика. Весьма вероятно, что этот остаток (или остатки) сближен с остатком 516 β -субъединицы. Поскольку связывание рифампицина с холоферментом не влияет на доступность остатков триптофана этиленгликолю, а также не сказывается на тушении флуоресценции иодидом калия и акриламидом, можно

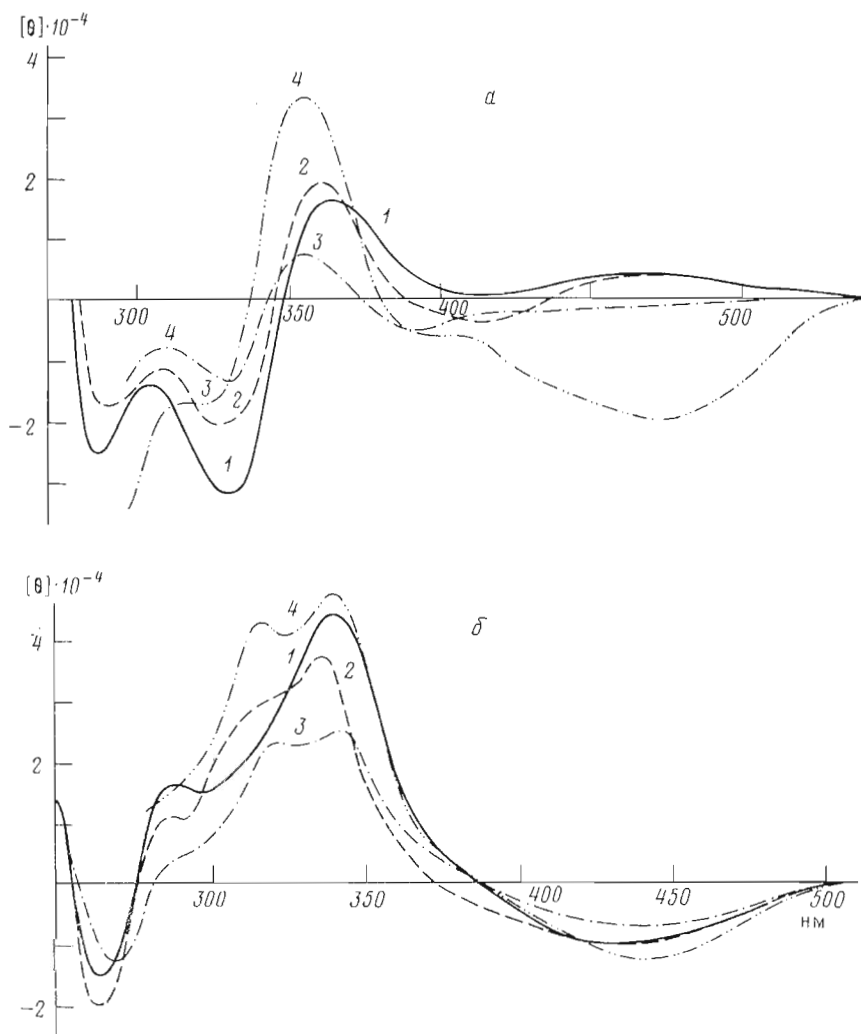


Рис. 7. Спектры КД рифамицина (а) и рифамицина SV (б) в этаноле (1, 2), буфере (3) и в комплексе с РНК-полимеразой (4) при 20 (1, 3, 4) и -80°C (2)

заключить, что указанный остаток (или остатки) триптофана расположен в гидрофобном окружении.

Недавно в работе [18] была предложена модель связывания антибиотика с РНК-полимеразой, согласно которой карбоксильная группа остатка Asp^{516} образует водородную связь с гидроксильной группой при $\text{C}_{(23)}$ ансацепи. Тот факт, что замена остатка Asp^{516} приводит к резкому изменению эффективности тушения антибиотиком флуоресценции по крайней мере одного из внутренних остатков триптофана, на наш взгляд, подтверждает и дополняет эту модель.

Авторы выражают благодарность О. Ю. Чертову и В. М. Динькину (ИБХ АН СССР) за предоставление образцов РНК-полимеразы и ее отдельных субъединиц.

Экспериментальная часть

В работе использованы растворы РНК-полимеразы и ее субъединиц в 0,01 М трис-НСI-буфере, содержащем 1 мМ EDTA и 0,1 мМ дитиотреита. Все опыты, если нет других указаний, выполнены при pH 7,7 и 20°C . Концентрации белков определяли спектрофотометрически, используя значения $A_{\text{см},280}^{1\%}$, приведенные в работе [11]: α -субъединица — $3,1 \pm 0,2$, β -субъединица — $5,2 \pm 0,4$, кор-фермент — $5,8 \pm 0,3$, холофермент — $6,7 \pm 0,4$.

Спектральные измерения выполнены на дихрографе Mark (III) (Jobin

Ivon, Франция), спектрофотометре Acta M-VI (Beckman, Австрия) и спектрофлуориметрах SPF-1000 (Aminco, США) и MPF-3 (Hitachi, Япония). Для измерения рН использовали комбинированный полумикроэлектрод и рН-метр «рН-asar» (Beckman, Австрия).

Растворы РНК-полимеразы, а также рифамицина SV и рифампицина готовили непосредственно перед измерениями. Разбавление раствора фермента в результате добавления антибиотика не превышало 0,5%. При флуоресцентных измерениях поглощение белка на длине волны возбуждения (295 нм) не превышало 0,1; излучение регистрировали при 335 нм. Снижение интенсивности флуоресценции белка за счет эффекта внутреннего фильтра и поглощения света антибиотиками учитывали как описано в работе [19]. Эллиптичность ($[\theta]$) в далекой УФ-области рассчитывали на один аминокислотный остаток с молекулярной массой 113.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chamberlin M. I. In: The Enzymes / Ed. Boyer P. D. London: Acad. Press, 1982, v. 15, p. 61–86.
2. Zillig W., Palm P., Heil A., Seifert W. In: Cold Spring Harbor Symp. quart. Biol., 1970, p. 35–47.
3. Riva S., Silvestri L. G. In: Annual Reviews of Microbiology / Eds Clifton C. E., Raffel S., Stare M. P. Annual Reviews Inc. Palo Alto, California, USA, 1972, v. 26, p. 199–224.
4. Zillig W., Palm P., Heil A. In: RNA polymerase / Eds Zosick R., Chamberlin M. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1976, p. 101–125.
5. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. G., Gubanov V. V., Guruyev S. O., Chertov O. Yu., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Makarova I. A., Marchenko T. V., Polovnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, № 3, p. 621–629.
6. Дешко Т. Н., Куделина И. А. Матер. V совещания по конформационным изменениям биополимеров в растворах. Телави, 1980, с. 105.
7. Chen Y.-H., Jang Y. T., Chau K. H. Biochemistry, 1974, v. 13, № 16, p. 3350–3359.
8. Бологина И. А., Чехов В. О., Лугаускас В. Ю., Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, вып. 4, с. 891–901.
9. Бологина И. А., Чехов В. О., Лугаускас В. Ю., Птицын О. Б. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, вып. 4, с. 902–909.
10. Бологина И. А., Чехов В. О., Лугаускас В. Ю., Птицын О. Б. Молекулярн. биология, 1981, т. 15, вып. 1, с. 167–175.
11. Levine B. J., Orphanos P. D., Fischmann B. S., Veyschok S. Biochemistry, 1980, v. 19, № 21, p. 4808–4814.
12. Козан Г. А. Физические методы в молекулярной биологии. Сер. «Молекулярная биология». Изд-во ВИНТИ, 1973, т. 3, с. 216–286.
13. Бурштейн Э. А. Люминесценция белковых хромофоров. Сер. «Бисфизика». Изд. ВИНТИ, 1977, т. 7, с. 112.
14. Meares C. F., Rice L. S. Biochemistry, 1980, v. 19, № 3, p. 600–617.
15. Stendler W., Scheit K. H. Eur. J. Biochem., 1977, v. 76, № 2, p. 591–600.
16. Wu C.-W., Goldthwait D. A. Biochemistry, 1969, v. 8, № 11, p. 4450–4458.
17. Stryer L. In: Annual Review of Biochemistry / Eds Snell E. E., Boyer P. D., Meister A., Richardson C. C. California, 1978, v. 47, p. 819–846.
18. Чернов О. Ю., Обухов А. В., Лункин В. М. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 633–639.
19. Yarbrough L. R., Wu C.-W., Wu F. J.-H. Biochemistry, 1976, v. 15, № 12, p. 2669–2676.

Поступила в редакцию
3.X.1983

PHYSICO-CHEMICAL STUDIES OF DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE-FROM *ESCHERICHIA COLI* AND ITS SUBUNITS

DESHKO T. N., KUDELINA I. A., SURIN A. M.

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

CD and UV spectroscopy were employed to study at different temperatures the conformational states of the DNA-dependent RNA polymerase core- and holo-enzymes, as well as of its α and β subunits. Both core- and holo-enzyme were shown to have a higher percentage of regular structures than the separate subunits. CD and fluorescence methods were used to monitor the complex formation between rifamycin SV or its derivative, rifampicin, with the RNA polymerase from the *E. coli* wild and mutant (Rpo B255) types, the former enzyme being sensitive and the latter being resistant to these antibiotics. Complexation led to concomitant changes in the conformation of antibiotics and local structural rearrangements of the protein in vicinity of the binding site which comprises at least one tryptophan residue in a hydrophobic microenvironment.