



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

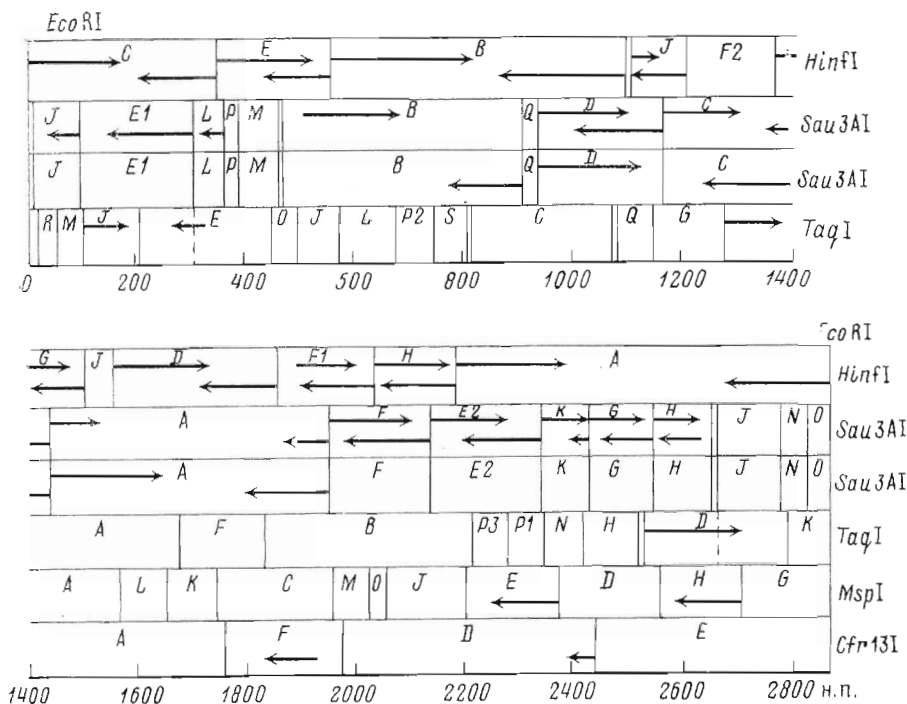
УДК 577.214.622 : 575.224

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУТАЦИИ, ПРИВОДЯЩЕЙ К УСТОЙЧИВОСТИ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI* К АНТИБИОТИКУ
СТРЕПТОЛИДИГИНУ, В ГЕНЕ *groV*, КОДИРУЮЩЕМ
β-СУБЪЕДИНИЦУ ФЕРМЕНТА*Лисицын Н. А., Свердлов Е. Д., Моисеева Е. И.*,
Никифоров В. Г.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина академии наук СССР, Москва;
* Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва*

Для изучения структуры активного центра фермента и механизмов, приводящих к нарушению его работы, используется подход, основанный на локализации мутаций устойчивости фермента к антибиотикам. Ранее нами было локализовано 10 мутаций устойчивости РНК-полимеразы *E. coli* к антибиотику рифампицину (*rif-r*-мутаций) в составе гена *groV*, кодирующего β-субъединицу фермента [1–4]. В данной работе впервые была локализована мутация устойчивости РНК-полимеразы к антибиотику стрептолидигину (*stl-r*-мутация) в составе того же гена (стрептолидигин любезно предоставлен фирмой Upjohn).

Мутации устойчивости к антибиотику стрептолидигину изменяют β-субъединицу РНК-полимеразы в клетках *E. coli* [5, 6]. Поэтому *stl-r*-мутацию получали в плазмиде pIV1, содержащей экспрессирующийся ген *groV* с мутацией *groV255* [7]. Бактерии с плазмидой выращивали в ночной культуре с нитрозогуанидином (20 мкг/мл), выделяли плазмидную ДНК и проводили трансформацию штамма RTS 522, чувствительного к стрептолидигину. Среди 1600 трансформантов, выросших на агаре с рифампицином (50 мкг/мл), были отобраны два клона, в которых устойчивость к стрептолидигину определяется плазмидой. Фрагмент с *stl-r*-мутацией, обозначенной *groV1018*, субклонировали с помощью рестриктазы *EcoRI* в состав вектора pBR322. О наличии *stl-r*-мутации во фрагменте гена *groV* судили по рекомбинации плазмиды с хромосомой, как описано ранее [2]. Мутация *groV1018* оказалась в том же фрагменте ДНК, что и мутация *groV255*. При этом РНК-полимераза, выделенная из двойного мутанта, несущего замены *groV255* и *groV1018*, сохраняла *in vitro* ~90% активности в присутствии 100 мкг/мл стрептолидигина в отличие от полностью подавляемого фермента из штамма, содержащего только *rif-r*-мутацию *groV255*.

Фрагмент ДНК, содержащий мутацию, выделяли из плазмиды препаративным электрофорезом в 1% агарозе после рестрикции эндонуклеазой *EcoRI*. Нуклеотидную последовательность полученного фрагмента определяли модифицированным методом Максама — Гилберта [8]. Полинуклеотиды, меченные по одному концу, получали разделением цепей или повторной рестрикцией двухцепочечных субфрагментов. В то же время небольшую часть структуры определяли методом Сэнгера [9] (модификация с применением терминирующих дидезоксинуклеозидтрифосфатов). При этом определялась первичная структура *Sau3AI*-субфрагментов А, В, С и D, клопированных в *BamHI*-сайт бактериофага M13 mp8 (рисунок).



Карта расщепления фрагмента *EcoRI*-C рестрикционными эндонуклеазами. Длина установленных последовательностей субфрагментов обозначена стрелками.

В ходе работы было показано, что в результате мутации появляется дополнительный сайт расщепления субфрагмента *Hinf*I-B рестрикционной эндонуклеазой *Hinf*I. Сравнение полученной первичной последовательности фрагмента *EcoRI*-C со структурой гена *proB* дикого типа позволило выявить двойную замену $G^{1712} \rightarrow A, T^{1715} \rightarrow C$, приводящую к возникновению нового *Hinf*I-сайта расщепления, и соответствующую ей замену аминокислотных остатков $Gly^{544} \rightarrow Asp, Phe^{545} \rightarrow Ser$.

Таким образом, *stil-r*-мутация локализуется в том же участке *proB*-гена, где ранее нами были локализованы 9 из 10 изученных *rif-r*-мутаций (замены аминокислотных остатков 516, 526, 531 и 564) [1-4]. Механизм действия этих антибиотиков различен. Стрептолидинги является ингибитором элонгации, конкурируя с элонгирующим нуклеозидтрифосфатом за место связывания на РНК-полимеразе [10]. Рифампицин блокирует продуктивную инициацию РНК [11], по-видимому, вследствие конкуренции с РНК-продуктом [12]. Поэтому можно полагать, что участок β -субъединицы РНК-полимеразы, включающий аминокислоты 516-564, принимает участие в образовании как центра связывания элонгирующего NTP, так и центра связывания и транслокации синтезируемой РНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Lipkin V. M., Sverdlov E. D., Kiver I. F., Bass I. A., Mindlin S. Z., Danilevskaya O. N., Khesin R. B. Mol. Gen. Genet., 1981, v. 184, № 3, p. 536-538.
2. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Guryev S. O., Kalinina N. F., Sverdlov E. D., Gragerov A. I., Bass I. A., Kiver I. F., Moiseyeva E. P., Igumnov V. N., Mindlin S. Z., Nikiforov V. G., Khesin R. B. Mol. Gen. Genet., 1983, v. 190, № 3, p. 344-348.
3. Лисицын Н. А., Гурьев С. О., Сverdlov Е. Д., Моисеева Е. П., Никифоров В. Г. Биоорг. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 127-128.
4. Lisitsyn N. A., Sverdlov E. D., Moiseyeva E. P., Nikiforov V. G. Mol. Gen. Genet., 1984, v. 196, № 1, p. 173-174.
5. Iwakura Y., Ishihama A., Yura T. Mol. Gen. Genet., 1973, v. 121, № 2, p. 181-193.
6. Heil A., Zillig V. FEBS Lett., 1970, v. 10, № 3, p. 165-168.

7. Басс И. А., Мехедов С. И., Куренова Е. В. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, № 3, с. 575-579.
8. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Kraev A. S., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zacharyev V. M., Bayev A. A. Gene, 1979, v. 6, № 3, p. 235-249.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 12, p. 5463-5467.
10. McClure W. R. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 4, p. 1610-1616.
11. McClure W. R., Cech C. L. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 24, p. 8949-8956.
12. Kessler C., Hartmann G. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 74, № 1, p. 50-56.

Поступило в редакцию
13.VII.1984

LOCALIZATION OF A MUTATION LEADING TO ANTIBIOTIC STREPTOLYDIGIN
RESISTANCE OF *E. COLI* RNA POLYMERASE IN THE *rpoB* GENE CODING
FOR β -SUBUNIT OF THE ENZYME

LISITSYN N. A., SVERDLOV E. D., MOISEYEVA E. P.*, NIKIFOROV V. G.*

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

For the first time a mutation of streptolydigin resistance was localized. It was discovered to be a double substitution, namely Gly⁵⁴⁴→Asp, Phe⁵⁴⁵→Ser, in the region where most *rif-r* mutations are located. One may suppose that this region takes part in the formation of both elongation NTP binding site, blocked by streptolydigin, and RNA chain binding and translocation site that is blocked by rifampicin.