



УДК 577.152.277*6.088:575.224.22:577.214.45

АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В β -СУБЪЕДИНИЦЕ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*, КОМПЕНСИРУЮЩИЕ
МУТАЦИОННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ФАКТОРА ТЕРМИНАЦИИ ρ Огрызко Е. П., Никифоров В. Г., Горюдин А. М. *,
Данилькович А. В. *, Монастырская Г. С. *

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва:

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

Одним из компонентов сложного комплекса белков, участвующих в терминеции синтеза РНК при транскрипции, является ρ -фактор [1]. Он присоединяется к растущей цепи РНК и, возможно, непосредственно контактирует с РНК-полимеразой. Косвенным указанием на существование таких контактов служит то, что некоторые мутации в гене β -субъединицы РНК-полимеразы, приводящие ее к устойчивости к рифампицину, супрессируют температурочувствительный фенотип различных мутантов с поврежденным ρ -фактором [2, 3]. Можно надеяться, что идентификация аминокислотных замен β -субъединицы, компенсирующих мутационные повреждения ρ -фактора, даст ценную информацию об участках РНК-полимеразы, существенных для терминеции транскрипции. Ранее мы определили нуклеотидную последовательность клонированных фрагментов мутантных генов β -субъединицы РНК-полимеразы у 10 устойчивых к рифампицину мутантов *E. coli* [4—6] и одного устойчивого к стрептолидигину [7], что позволило идентифицировать соответствующие аминокислотные замены.

В данной работе мы идентифицировали еще одну мутацию устойчивости к рифампицину — *rpoB268*. Для этого ДНК, выделенную из штамма *E. coli* R34(*rpo268*), рестрицировали *EcoRI* и лигировали с вектором pBR322, расщепленным той же рестриктазой. После трансформации клеток *E. coli* C600 (F^- , *thi-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*, λ^-) проводили селекцию *rif^r*-рекомбинантов [5]. В результате был отобран клон, содержащий *EcoRI*-С-фрагмент гена *rpoB* [8]. Субклонирование показало, что мутация *rpoB268* локализуется в *MspI*-фрагменте гена *rpoB* (1251—2136 п.о.). Определение первичной структуры этого фрагмента по методу Сэнгера [9, 10] позволило установить, что в нем имеется нуклеотидная замена в кодоне 513 (CAG \rightarrow CTG), результатом которой является замена Gln \rightarrow Leu в β -субъединице РНК-полимеразы.

Мы решили проверить эту мутацию и мутации, изученные ранее [4, 6], на способность супрессировать *ts*-фенотип мутации *rho15* (мутация ρ -фактора, определяющая неспособность клеток расти при 42° С). Вводить их в штамм *E. coli* МКД6259 (*arg⁻*, *rho15*) пришлось в два этапа, поскольку он не трансформировался плазмидами pBR322, содержащими фрагменты гена *rpoB* с *rif^r*-мутациями. На первом этапе плазмиды с этими фрагментами были введены в штамм *E. coli* LE392 (F^- , *hsdR514*, (*r_K⁻*, *m_K⁻*), *supE44*, *sup58*, *lacY1*, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*, λ^-) и были отобраны *rif^r*-клоны, возникшие в результате рекомбинации между плазмидой и хромосомой [5]. Затем *rif^r*-аллели из этих клонов с помощью трансдуцирующего фага P1 перенесли в клетки *E. coli* МКД6259. У *rif^r*-трансдуктантов определили способность расти при 42° С. Результаты опытов (таблица) свидетельствуют, что мутация *rpoB1019* и идентифицированная в данной работе — *rpoB268* способны супрессировать мутацию *rho15*.

Мутация <i>rhoB</i>	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Число проверенных <i>arg⁺</i> -транскриптантов	Число <i>arg⁺</i> , <i>rif^r</i> -транскриптантов	Рост <i>rif^r</i> -транскриптантов при 42° С
1019	GTT → TTT	Val ¹⁴⁶ → Phe	49	43	+
268	CAG → CTG	Gln ⁵¹³ → Leu	143	82	+
255	GAC → GTC	Asp ⁵¹⁶ → Val	22	10	-
1016	GAC → AAC	Asp ⁵¹⁶ → Asn	23	8	-
1001	CAC → TAC	His ⁵²⁶ → Tyr	6	3	-
1004	TCC → TTC	Ser ⁵³¹ → Phe	25	12	-
1005	CCT → CTT	Pro ⁵⁶⁴ → Leu	25	16	-
255	GAC → GTC	Asp ⁵¹⁶ → Val	28	11	-
1018	{ GGC → GAC TTC → TCC	{ Gly ⁵⁴⁴ → Asp Phe ⁵⁴⁵ → Ser	27	15	-

Таким образом, мы установили, что две *rif^r*-мутации, одна из которых расположена в области локализации большинства мутаций рифампицин-устойчивости, а другая — на некотором удалении, влияют на взаимодействие РНК-полимеразы с ρ -фактором. Остальные проверенные *rif^r*-мутации не влияют на фенотипическое проявление мутации *rho15*. Однако не исключено, что некоторые из них могут влиять на фенотипическое проявление других ρ -аллелей. О такой возможности свидетельствуют данные работы [11], в которой были изучены *rif^r*-мутации, идентичные мутациям *rhoB1003* и *rhoB1004*, влияющие на аттенюацию гена *pyr*. Поэтому можно полагать, что области, затронутые *rif^r*-мутациями, в той или иной степени вовлечены в процесс терминации транскрипции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Platt T. // Ann. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 339—372.
2. Das A., Merril C., Adhya S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1968. V. 75. № 10. P. 4828—4832.
3. Zograf Yu. N., Gintsburg A. L. // Mol. Gen. Genet. 1980. V. 177. № 4. P. 699—705.
4. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Guriev 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. № 2. P. 344—348.
5. Lisitsyn N. A., Sverdlov E. D., Moiseyeva E. P., Danilevskaya O. N., Nikiforov V. G. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 194. № 1. P. 173—174.
6. Луцицин Н. А., Гурьев С. О., Свердлов Е. Д., Моисеева Е. П., Никуфоров В. Г. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 1. С. 127—128.
7. Луцицин Н. А., Свердлов Е. Д., Моисеева Е. П., Никуфоров В. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 1. С. 132—134.
8. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Chertov O. Yu., Modyanov N. N., Grinkevitch 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.
9. McGraw R. A. // Annal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298—303.
10. Sanchez-Pescador R., Urdea M. S. // DNA. 1984. V. 3. № 4. P. 339—343.
11. Hammer K., Jensen K. F., Poulsen P., Oppenheim A. B., Gottesman M. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 11. P. 5289—5297.

Поступило в редакцию
9.11.1988

AMINO ACID SUBSTITUTIONS IN β -SUBUNIT
OF RNA POLYMERASE COMPENSATING FOR A MUTATIONALLY
DAMAGED ρ -FACTOR IN *E. COLI*

OGRYZKO E. P., NIKIFOROV V. G., BORODIN A. M.*,
DANILKOVICH A. B.*, MONASTYRSKAYA G. S.*

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

Ts-phenotype of the *E. coli* ρ -factor mutant *rho15* is suppressed by two rifampicin-resistance mutations, *rhoB1019* resulting in a single amino acid substitution Val¹⁴⁶ → Phe and *rhoB268* resulting in a single substitution Gln⁵¹³ → Leu in β -subunit of the *E. coli* RNA polymerase. Rifampicin-resistance mutations *rhoB255* (Asp⁵¹⁶ → Val), *rhoB1016* (Asp⁵¹⁶ → Asn), *rhoB1001* (His⁵²⁶ → Tyr), *rhoB1004* (Ser⁵³¹ → Phe), *rhoB1005* (Pro⁵⁶⁴ → Leu), and streptolydigin-resistance mutation *rhoB1018* (double substitution Gly⁵⁴⁴ → Asp and Phe⁵⁴⁵ → Ser) do not suppress the *rho15* mutation.