

Рис. 2. Флуориметрическое титрование Rif^s (1) и Rif^r (2) РНК-полимераз рифамицином. Концентрация РНК-полимеразы $3,2 \cdot 10^{-7}$ М. По оси абсцисс – отношение концентрации рифамицин – фермент

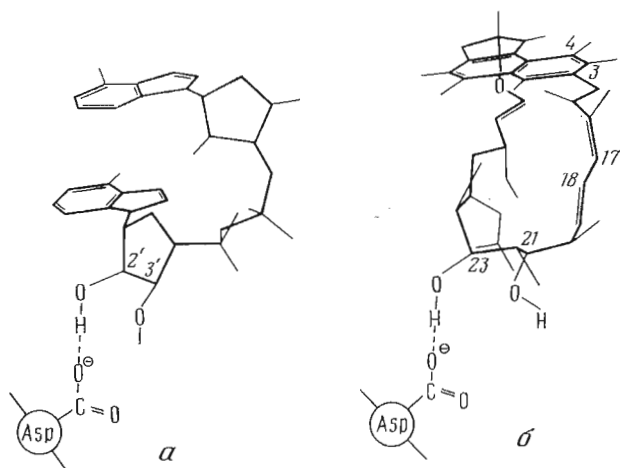


Рис. 3. Пространственная структура $\gamma(ApA)$ [12] (а) и рифамицина [11] (б). Структуры представлены таким образом, что их аналогия наиболее очевидна. Показана водородная связь ОН-групп динуклеотидного фрагмента и антибиотика с гипотетическим остатком аспарагиновой кислоты РНК-полимеразы

та. Затем Макклур и Сеч, проанализировав продукты, образуемые РНК-полимеразой в присутствии рифамицина на различных промоторах ДНК фага λ , предложили схематическую модель ингибирования. Согласно этой модели, рифамицин располагается в транскрипционном комплексе на пути РНК-продукта и препятствует транслокации динуклеотида, тем самым останавливая дальнейший синтез РНК. Однако авторы подчеркивали, что их модель предназначена лишь для наглядного представления полученных результатов и неадекватна действительной организации активного центра фермента [7].

В настоящей работе молекулярный механизм ингибирования РНК-полимеразы рифамицином изучался путем сравнительного анализа свойств рифамицин-чувствительной (Rif^s) и рифамицин-устойчивой (Rif^r) РНК-полимераз. На основании такого анализа, а также выявленной аналогии пространственных структур рифамицина и динуклеотидного звена РНК предложена молекулярная модель ингибирования.

С целью выяснения молекулярного механизма ингибирования РНК-полимеразы рифамицином мы провели сравнительное изучение рифамицин-чувствительной (Rif^s) РНК-полимеразы дикого штамма *E. coli* В и рифа-

миция-устойчивой (Rif^r-) РНК-полимераза мутантного штамма *E. coli* rpo B255. Прежде всего нас интересовало, сохраняет ли мутантный фермент способность связывать антибиотик. Для изучения связывания антибиотика Rif^s- и Rif^r-РНК-полимеразами мы использовали обнаруженное Ченг-Вен Ву явление тушения флуоресценции остатков триптофана фермента при связывании им рифамицина [8]. Флуориметрическое титрование показало, что Rif^r-РНК-полимераза, как и Rif^s-фермент, связывает антибиотик (рис. 2). Несмотря на то что константа диссоциации комплекса Rif^r-РНК-полимераза с рифамицином ($(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$ М) выше, чем в случае Rif^s-РНК-полимераза ($\leq 10^{-9}$ М, см. также [9] и [10]), Rif^r-РНК-полимераза сохраняет способность связывать антибиотик. Возможно, что участок связывания рифамицина не исчезает полностью в результате мутации.

Какими конкретно структурными особенностями должен обладать рифамицинсвязывающий участок фермента?

Как уже отмечалось, Макклор с сотрудниками выдвинули предположение о блокировании рифамицином транслокации 5'-конца синтезируемой РНК внутри транскрипционного комплекса [6, 7]. Если блокирование происходит вследствие того, что антибиотик непосредственно занимает место РНК-продукта, то с участком связывания рифамицина должна связываться также и РНК. В этом случае можно ожидать аналогии в пространственных структурах рифамицина и РНК. Для выявления такой аналогии мы построили соответствующие модели Дрейдинга, используя данные рентгеноструктурного анализа кристаллов рифамицина В [11] и волокон гибрида poly(rA)·poly(dT), который, согласно данным Циммермана и Пфайфера [12], в условиях высокой относительной влажности принимает конформацию, подобную В-форме ДНК. Сравнение этих моделей позволило выявить определенное сходство пространственных структур рифамицина и динуклеотидного звена РНК в составе указанного гибрида (рис. 3). Если совместить плоскости ароматического кольца динуклеотидного звена и рифамицина, а также гликозидную связь нуклеотида со связью C₍₃₎-C₍₄₎ антибиотика, то существенные для взаимодействия антибиотика гидроксильные группы при C₍₂₁₎ и C₍₂₃₎ [1] совпадут с 3'- и 2'-ОН-группами остатка рибозы динуклеотида. Такое пространственное подобие фрагмента РНК и рифамицина является достаточно веским основанием для того, чтобы считать, что рифамицин блокирует транслокацию не каким-то косвенным образом, а непосредственно занимая часть участка связывания РНК-продукта.

Пространственное совпадение гидроксильных групп рифамицина с гидроксильными группами рибодинуклеотида, а также известные данные о заметном вкладе водородных связей, образующихся между 2'-гидроксильными группами рибонуклеотидов и карбоксильными группами остатков аспарагиновых кислот, в РНК-белковое взаимодействие [13] позволили сделать предположение о существовании некоего остатка аспарагиновой кислоты в РНК-полимеразе, который образует водородную связь с гидроксильной группой при C₍₂₃₎ рифамицина (рис. 3).

Недавно при определении нуклеотидной последовательности гена β-субъединицы РНК-полимеразы мы установили, что устойчивость мутанта *E. coli* rpoB255 к рифамицину связана с заменой остатка аспарагиновой кислоты-516 β-субъединицы на остаток валина [14]. Принимая во внимание этот факт, мы предполагаем, что гипотетическим остатком аспарагиновой кислоты, образующим водородную связь с гидроксильной группой при C₍₂₃₎ рифамицина (как и с 2'-ОН группой РНК-продукта), является остаток Asp⁵¹⁶ β-субъединицы. Отсутствие этого остатка в РНК-полимеразе мутантного штамма *E. coli* rpoB255 приводит к появлению у нее устойчивости к антибиотику.

В литературе имеются противоречивые данные относительно длины рибонуклеотидов, синтезируемых в присутствии рифамицина. Макклор и Сеч [7] показали, что в присутствии рифамицина на промоторах бактериофага λ p_L и p_R синтезируется динуклеотид pppApU, а на промоторе p_{R'} — тринуклеотид pppApUpC. Затем Карпоусис и Гралла [15] обнаружили, что

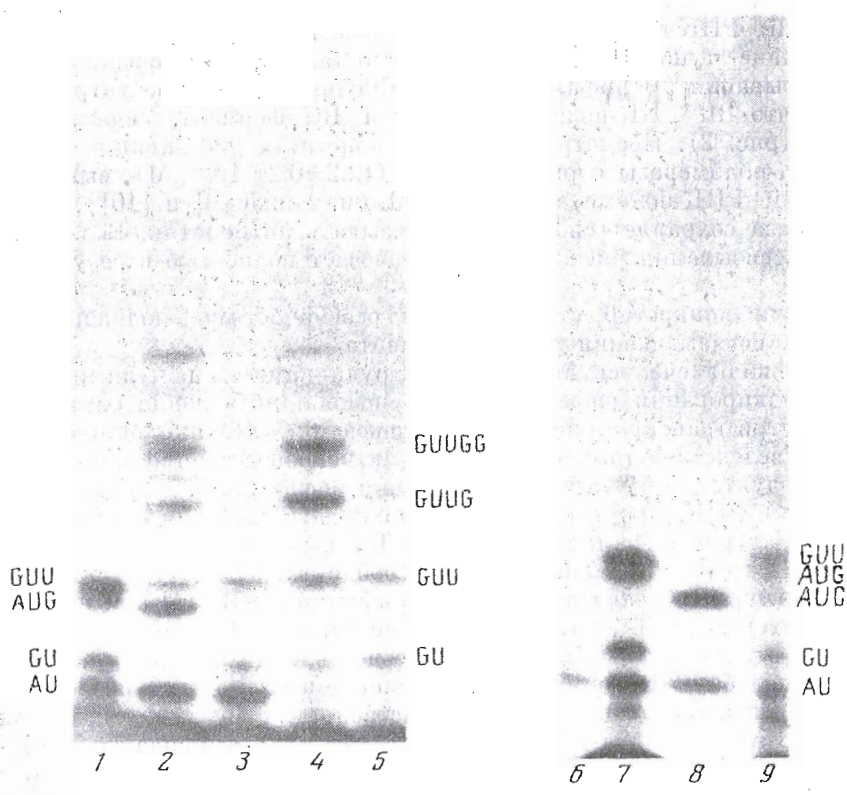


Рис. 4. Авторадиограмма пластины 25% полиакриламидного геля после разделения продуктов, синтезированных Rif^R -РНК-полимеразой на *BsuI*-фрагменте ДНК фага Т7 в присутствии: 1, 7 – АТФ, ГТФ, СТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$, рифамицина; 2 – АТФ, ГТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$; 3 – АТФ, ГТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$, рифамицина; 4 – ГТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$; 5 – ГТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$, рифамицина; 6 – АТФ, СТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$; 7 – АТФ, ГТФ, СТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$; 8 – АТФ, ГТФ, СТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$, рифамицина; 9 – АТФ, ГТФ, СТФ, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$, $rrrArU$

рифамицин не мешает образованию тринуклеотида $rrrArArU$ на *lacUV5*-промоторе. Для уточнения влияния рифамицина на длину синтезируемых рибонуклеотидов мы проанализировали продукты, образуемые РНК-полимеразой на *BsuI*-фрагменте ДНК фага Т7, содержащем промоторы A_0 , A_1 , A_2 и A_3 , с которых иницируется синтез РНК с последовательностями $rrrGUUGGC\dots$, $rrrAUCGA\dots$, $rrrGCUAG\dots$ и $rrrAUGAAAC\dots$ соответственно [16]. Из полученных результатов (рис. 4) видно, что по крайней мере с промоторов A_0 , A_1 и A_3 в присутствии рифамицина РНК-полимераза способна иницировать синтез тринуклеотидов. Интересно, что рифамицин по-разному влияет на abortивный синтез тринуклеотидов в зависимости от структуры промотора (или структуры синтезируемой РНК). При этом меньше синтезируется $rrrArUrG$ (A_3) относительно $rrrGrUrU$ (A_0) (рис. 4, колонки 2 и 3). По сравнению с $rrrArUrG$ и $rrrGrUrU$ подавляется синтез $rrrArUrC$ (A_1) (рис. 4, колонки 7–9). Такое сложное влияние рифамицина на abortивный синтез, а также различная чувствительность методов, применявшихся для анализа коротких продуктов, по-видимому, и явились причиной различных выводов, сделанных разными авторами относительно длины олигонуклеотидов, синтезируемых РНК-полимеразой в присутствии антибиотика [7, 15].

На основании наших результатов мы предлагаем следующую модель ингибирования (рис. 5). Рифамицин занимает в транскрипционном комплексе часть участка связывания РНК-продукта, а именно место двух 5'-концевых рибонуклеотидных звеньев синтезированного, но не транслонированного пентануклеотида. Прочно связавшись с этим участком, рифа-

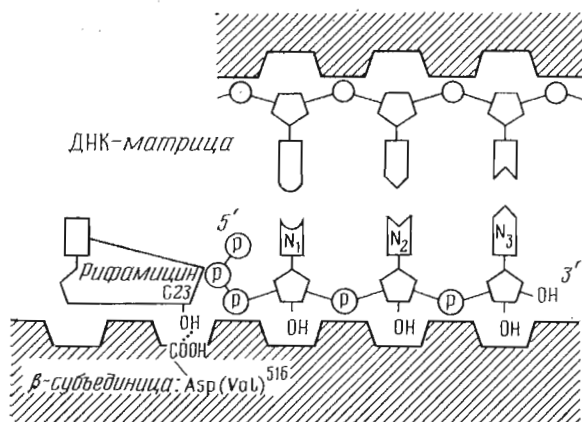


Рис. 5. Схематическая модель ингибирования РНК-полимеразы рифамицином

мицин мешает транслокации тринуклеотидов, ингибируя тем самым образование более длинных продуктов. В связывание рифамицина существенный вклад вносит водородная связь, образующаяся между его гидроксильной группой при $C_{(23)}$ и карбоксильной группой Asp^{516} β -субъединицы фермента. Замена остатка Asp на Val в β -субъединице мутантной РНК-полимеразы не разрушает участок связывания рифамицина, но из-за отсутствия стабилизирующей водородной связи рифамицин уже не является непреодолимым препятствием для растущей цепи РНК и вытесняется 5'-концом РНК из транскрипционного комплекса.

Рассмотрим, какие следствия вытекают из предложенной модели. Если участок связывания рифамицина локализован верно, то из-за отсутствия соответствующего остатка аспарагиновой кислоты рифамицин-устойчивая РНК-полимераза мутанта *E. coli rpoB255* также не образует водородной связи с синтезируемой РНК в участке связывания остатка рибозы (рис. 5). В результате связь с ферментом РНК-продукта, достигшего этого участка, ослаблена и это должно сказаться каким-то образом на способности рифамицин-устойчивой РНК-полимеразы к abortивному синтезу тетра- и более длинных олигонуклеотидов.

Для проверки этого предположения мы исследовали синтез РНК Rif^s - и Rif^r -РНК-полимеразами на *BsuI*-фрагменте ДНК фага Т7, содержащем промоторы A_0 , A_1 , A_2 и A_3 (рис. 6). Из приведенной автордиограммы видно, что в случае Rif^r -РНК-полимеразы abortивного синтеза олигорибонуклеотидов с длиной цепи от 4 до 10 по сравнению с Rif^s -полимеразой практически не наблюдается. Таким образом, предположение об измененной способности Rif^r -РНК-полимеразы осуществлять abortивный синтез подтвердилось экспериментально, что является доводом в пользу справедливости предложенной модели ингибирования РНК-полимеразы рифамицином.

Экспериментальная часть

В работе использовали рифампицин (Sigma, США), дитиотрент, додецилсульфат натрия, EDTA (Serva, ФРГ), трис (Merck, ФРГ), акриламид, N,N' -метилден-бис-акриламид (Bio-Rad, США), 30% бычий сывороточный альбумин (Difco, США), СТР, АТР, GTP и UTP (Reanal, Венгрия), $[\alpha\text{-}^{32}P]UTP$ 410 Ки/ммоль (Amersham, Англия), poly(dA-dT)·poly(dA-dT) (P-L Biochemicals, США), *BsuI*-фрагмент ДНК фага Т7 был любезно предоставлен М. А. Грачевым (Институт органической химии СО АН СССР).

Rif^s -РНК-полимеразу (РНК-нуклеотидилтрансфераза (ДНК-зависимая), КФ 2.7.7.6) выделяли из клеток *E. coli* В, а Rif^r -РНК-полимеразу — из клеток штамма *E. coli rpoB255*, любезно предоставленного В. Г. Ники-



Рис. 6. Авторадиограмма пластины 25% полиакриламидного геля после разделения продуктов, синтезированных Rif^S - и Rif^R -РНК-полимеразами в присутствии АТР, СТР и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$: 1 – Rif^S ; 2 – Rif^R ; 3 – Rif^S , рифамицин; 4 – Rif^R , рифамицин; 5 – pppApU ; 6 – $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$

форовым (Институт молекулярной генетики АН СССР). Выделение РНК-полимераз проводили по методу Бёрджеса [17], но вместо ДНК-целлюлозы использовали ДНК-агарозу, как описано в работе [18].

Измерение флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра MRF-3 (Hitachi, Япония) при длинах волн возбуждения 296 нм и эмиссии 332 нм. Растворы РНК-полимеразы доводили до концентрации $3,2 \cdot 10^{-7}$ М буферным раствором, содержащим 40 мМ трис-НСl, 0,1 М NaCl, 1 мМ EDTA и 0,1 мМ дитиотреит. Поскольку поглощение рифамицина в исследуемой области сильно перекрывается со спектром эмиссии, полученные данные по тушению флуоресценции приводились в соответствие с поглощением рифамицина [19]. Полученная кривая насыщения использовалась для расчета константы диссоциации [20].

Синтез РНК проводили в буферном растворе, содержащем 40 мМ трис-НСl (рН 7,9), 0,1 М NaCl, 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 0,05% бычий сывороточный альбумин, 200 мкМ GTP, 200 мкМ АТР, 40 мкМ СТР, 40 мкМ УТР (200 мкКи/мл $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$), 20 мкг/мл *BsuI*-фрагмента ДНК фага Т7 и 100 мкг/мл РНК-полимеразы. В опытах по изучению влияния рифамицина на синтез РНК РНК-полимеразу (1 мг/мл) предварительно инкубировали 10 мин при 25° С с 10-кратным избытком антибиотика (20 мкг/мл) в молярном отношении. Синтез РНК останавливали добавлением равного объема буферного раствора, содержа-

шего 0,1 М EDTA, 0,1% додецилсульфат натрия, 7 М мочевины, 50 мМ трис-борат (рН 8,3). Синтезированные олигонуклеотиды разделяли с помощью электрофореза в пластинах 25% поликриламидного геля (1,5×200×400 мм) в присутствии 8 М мочевины. Для автордиографии использовали рентгеновскую пленку РМ-1.

Синтез рrrrArU был осуществлен с помощью Rif^r-РНК-полимеразы на poly(dA-dT)·poly(dA-dT) (0,5 мг/мл) в присутствии рифамицина (50 мкг/мл). Время синтеза 20 мин при 37° С. Продукт был очищен путем хроматографирования на ватмане 3 ММ (Whatman, Англия), как описано в работе [6].

Для сравнения пространственных структур рифамицина и динуклеотидного фрагмента г(ArA) на основе данных работ [11, 12] были построены соответствующие модели Дрейдинга.

Авторы выражают искреннюю благодарность академику Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к данной работе, Т. А. Дешко и И. А. Куделиной за выполнение спектральных измерений и связанных с ними расчетов, М. А. Грачеву (Институт органической химии СО АН СССР) за предоставление фрагмента ДНК фага Т7, В. Г. Някифорову (Институт молекулярной генетики АН СССР) за предоставление рифамицин-устойчивого штамма *E. coli* ррoB255, а также ценные критические замечания по данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Riva S., Silvestri L. G. In: Annual Review of Microbiology/Ed. Clifton C. E., Raffel S., Stare M. P. Annual Reviews Inc. Palo Alto, California, USA, 1972, v. 26, p. 199–224.
2. Hartmann G. R., Honikel K. O., Knüsel F., Nüesch J. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 145, p. 843–844.
3. Wehrli W., Nüesch J., Knüsel F., Staehelin M. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 157, p. 215–217.
4. Wehrli W., Knüsel F., Schmid K., Staehelin M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, v. 61, p. 667–673.
5. Sippel A. E., Hartmann G. R. Biochim. et biophys. acta, 1968, v. 157, p. 218–219.
6. Johnston D. E., McClure W. R. In: RNA Polymerase/Eds Losick R., Chamberlin M. J. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, 1976, p. 413–428.
7. McClure W. R., Cech C. L. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 8949–8956.
8. Wu C. W., Goldthwait D. A. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 4450–4458.
9. Yarbrough L. R., Wu F. Y. H., Wu C. W. Biochemistry, 1976, v. 15, p. 2669–2676.
10. Bähr W., Stender W., Scheit K. H., Jovin T. M. In: RNA Polymerase/Eds Losick R., Chamberlin M. J. N. Y.: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Lab., 1976, p. 369–396.
11. Brufani M., Fedeli W., Giacomello G., Vaciano A. Experientia, 1964, v. 20, p. 339–342.
12. Zimmerman S. B., Pfeiffer B. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, p. 78–82.
13. Holmes K. C. Trends in Biochem. Sciences, 1980, v. 5, p. 4–7.
14. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Guryev 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, p. 621–629.
15. Carpousis A. J., Gralla J. D. Biochemistry, 1980, v. 19, p. 3245–3253.
16. Grachev M. A., Zaychikov E. F. FEBS Lett., 1980, v. 115, p. 23–26.
17. Burgess R. R., Jendrisak J. J. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 4634–4638.
18. Lowe P. A., Hager D. A., Burgess R. R. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 1344–1352.
19. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М: Мир, 1972, с. 235.
20. Пермяков Е. А., Yarmolenko V. V., Kalinichenko L. P., Morosova L. A., Burstein E. A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 100, p. 191–197.

Поступила в редакцию
2.XI.1982

CHERTOV O. Yu., OBUKHOV A. N., LIPKIN V. M.

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

By fluorimetric titration of Rif^s (*E. coli* B) and Rif^r (*E. coli* rpoB255) RNA polymerases with rifamycin, the mutant polymerase was demonstrated to bind rifamycin. A comparison of spatial structures of rifamycin and dinucleotide fragment of RNA in the hybrid with DNA revealed their similarity. Taking into account this structural similarity and also the fact that two phosphodiester bonds can be formed by RNA polymerase in the presence of rifamycin, a model for the inhibition mode was proposed. According to this model, rifamycin occupies the place of two terminal nucleotides of synthesized, but not translocated pentanucleotide in the transcribing complex. Asp-516 of the wild type β -subunit was assumed to form a hydrogen bond with the rifamycin C₍₂₃₎ hydroxyl group. On the base of this model, reduced «cycling» synthesis of tetra-, penta-... up to decanucleotides by the Rif^r RNA polymerase, in comparison with Rif^s, was predicted.