



УДК 547.963.32.02+547.96.02

НУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ В ГЕНЕ *rpoB*, ПРИВОДЯЩИЕ
К УСТОЙЧИВОСТИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *E. COLI*
К РИФАМПИЦИНУ

Лисицын Н. А., Гурьев С. О., Свердлов Е. Д.

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

Моисеева Е. П., Никифоров В. Г.

Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Рифампицин ингибирует транскрипцию у бактерий, образуя прочный комплекс с РНК-полимеразой. Изучение структуры центра связывания рифампицина существенно для понимания как механизма действия антибиотика, так и механизма каталитического функционирования РНК-полимеразы [1]. Одним из возможных подходов к выяснению структуры этого центра является определение аминокислотных замен РНК-полимеразы, происходящих в результате мутаций устойчивости к рифампицину. Эти мутации (*rif-r*) локализуются в гене *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы [2]. Ранее с помощью определения нуклеотидной последовательности мутантных *rpoB*-генов нами были идентифицированы аминокислотные замены для шести *rif-r*-мутаций [3, 4]. Было обнаружено, что эти шесть мутаций (три из которых являются спонтанными и три индуцированными гидроксиламином *in vitro*) затрагивают всего три положения аминокислотной последовательности β -субъединицы РНК-полимеразы, находящихся на небольшом расстоянии друг от друга (таблица). Это свидетельствует о том, что число положений, в которых возможны замены, приводящие к устойчивости к рифампицину (и не нарушающие при этом каталитические функции РНК-полимеразы), по-видимому, невелико.

В данной работе определены аминокислотные замены еще у трех *Rif-r*-мутантов. Чтобы увеличить вероятность обнаружения новых аминокислотных замен, не встретившихся у мутантов, изученных ранее, среди 15 мутантов, полученных нами ранее с помощью гидроксилamina [5], был отобран один (*rpoB1001*), отличающийся от всех остальных тем, что он значительно усиливал ts-фенотип мутанта *rpoC1* по гену β' -субъединицы РНК-полимеразы. Два мутанта (*rpoB1016* и *rpoB1017*) были индуцированы с помощью нитрозогуанидина, который, как считается, отличается более широким спектром мутагенного действия, чем гидроксиламин [6]. Индукцию мутаций осуществляли, выращивая клетки *E. coli* С600, содержащие плазмиду pIV1830 с центральным *EcoRI*-С-фрагментом *rpoB*-гена дикого типа, в присутствии нитрозогуанидина (15 мкг/мл) в бульоне в течение ночи. Из обработанных клеток выделяли плазмидную ДНК, трансформировали клетки *E. coli* С600 и среди трансформантов, устойчивых к тетрациклину, отбирали клоны, содержащие *rif-r*-мутации в плазмиде, как описано ранее [4].

Нуклеотидную последовательность фрагментов мутантных плазмид определяли по методу Максама — Гилберта, как описано ранее [7]. В каждой из плазмид найдено по одной замене G—C на A—T (таблица). Из таблицы видно, что мутация *rpoB1001* позволила идентифицировать четвертую аминокислоту His⁵²⁶, существенную для взаимодействия с рифампицином. В результате этой мутации гистидин заменился на тирозин, что привело к высокой степени устойчивости РНК-полимеразы к рифампицину *in vitro*.

Свойства исследованных мутантов, устойчивых к рифампицину

Мутация	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Уровень устойчивости к рифампицину *
<i>rpoB</i> 255 **	A(1628) → T	Asp(516) → Val	B
<i>rpoB</i> 3 **	C(1673) → T	Ser(513) → Phe	B
<i>rpoB</i> 1004 **	C(1673) → T	Ser(513) → Phe	B
<i>rpoB</i> 256 **	Δ	Δ	—
<i>rpoB</i> 1003 **	C(1772) → T	Pro(564) → Leu	H
<i>rpoB</i> 1005 **	C(1772) → T	Pro(564) → Leu	H
<i>rpoB</i> 1001	C(1657) → T	His(526) → Tyr	B
<i>rpoB</i> 1016	G(1627) → A	Asp(516) → Asn	H
<i>rpoB</i> 1017	G(1627) → A	Asp(516) → Asn	H

* В — высокий, H — низкий, «—» — не проверен.

** Данные опубликованы ранее [4].

Ранее нами было высказано предположение, что His⁵²⁶ может участвовать в каталитической функции РНК-полимеразы в качестве акцептора протона 3'-гидроксильной группы РНК — продукта при образовании фосфодиэфирной связи [3]. Тот факт, что РНК-полимераза мутанта *rpoB*1001 обладает нормальной ферментативной активностью, ставит под сомнение это предположение. Можно думать, что His⁵²⁶ участвует во взаимодействии с одной из гидроксильных групп рифампицина.

Независимо полученные под действием нитрозогуанидина мутации *rpoB*1016 и *rpoB*1017 привели к идентичным заменам G—C на A—T в положении 1627 (замена Asp⁵¹⁶ на Asn), в результате чего РНК-полимераза приобрела слабую устойчивость к рифампицину *in vitro*. Ранее нами были описаны другие замены Asp⁵¹⁶ (см. таблицу), приводящие к высокой степени устойчивости РНК-полимеразы к рифампицину. Данные по мутациям *rpoB*1016 и *rpoB*1017 не противоречат этому предположению, если допустить, что и Asn способен реагировать с рифампицином, хотя и с меньшей эффективностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kessler C., Huai Feng M., Hartmann G. R. Eur. J. Biochem., 1982, v. 122, № 3, p. 515–518.
2. Heil A., Zillig W. FEBS Lett., 1970, v. 11, № 3, p. 165–168.
3. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Lipkin V. M., Sverdlov E. D., Kiver I. F., Bass I. A., Mindlin S. Z., Danylevskaya O. N., Khesin R. B. Mol. Gen. Genet., 1981, v. 184, № 3, p. 536–538.
4. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Monastyrskaya G. S., Kalinina N. F., Sverdlov E. D., Gragerov A. J., 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. Nikiforov V., Bass I., Larionov O., Igumnov V. In: Metabolism and enzymology of nucleic acids/Eds Zelinka G., Balam G. Bratislava: Publ. House of Slovak Academy of Sciences, 1982, v. 4, p. 201–202.
6. Gichner T., Veleminsky G. Mutat. Res., 1982, v. 99, № 2, p. 129–242.
7. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Krayev A. S., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zakharyev B. M., Bayev A. A. Gene, 1979, v. 6, № 3, p. 235–249.

Поступило в редакцию
2.VIII.1983

NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN THE *rpoB* GENE LEADING TO RIFAMPICIN RESISTANCE OF *E. COLI* RNA POLYMERASE

LISITSYN N. A., GURJEV S. O., SVERDLOV E. D., MOYSEYEVA E. P.,
NIKIFOROV V. G.

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

Three new *rif-r*-mutations, obtained independently, were localized in the *rpoB* gene coding for the β-subunit of DNA-dependent RNA polymerase of *E. coli*. Two of them led to identical Asp(516)-Asn amino acid substitution with relatively low resistance of corresponding *E. coli* strains to rifampicin. The third mutation affected the His 526 residue transforming it into Tyr and endowed the *E. coli* cells with a high resistance against rifampicin.