

На правах рукописи

Зоров Савва Дмитриевич

**Структурно-функциональные исследования активного центра
бактериальной РНК-полимеразы.**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук.**

Москва - 2005

Работа выполнена в отделе биоэнергетики института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова и в лаборатории К. Северинова института им. Ваксмана, университета Ратгерс, США (Waksman Institute, Rutgers University, USA)

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор Д.Б. Зоров

кандидат биологических наук,
К. Северинов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор Т.А. Валуева

кандидат биологических наук,
А.В. Кульбачинский

Ведущая организация: Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится «14» июня 2005 года в 16 часов на заседании диссертационного совета К 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученых степеней кандидатов наук в Институте Биохимии имени А.Н. Баха РАН по адресу: 119071 Москва, Ленинский пр-т., 33, корп. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке Биологической Литературы по адресу: 119071 Москва, Ленинский пр-т., 33, корп. 1

Автореферат разослан «13» мая 2005 года

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук


А.Ф. Орловский

2006-4
25584

224/931

Актуальность проблемы. ДНК-зависимые РНК-полимеразы (РНКП) осуществляют процесс транскрипции, т.е. создание РНК-копии генов для последующей трансляции. Выделяют три стадии транскрипционного цикла: инициацию, элонгацию и терминацию, при этом непосредственно реакция полимеризации происходит на стадии элонгации. Ключевым этапом процесса элонгации является образование фосфодиэфирной связи между входящим субстратом (нуклеозидтрифосфатом) и 3'-концевым нуклеотидом цепи РНК в активном центре РНКП. Несмотря на множество биохимических и структурных данных, механизм функционирования активного центра РНКП в целом остается не полностью изученным.

Недавно была предложена модель, в соответствии с которой реакция образования фосфодиэфирной связи в активном центре РНКП, равно как и другие виды активностей, такие как расщепление РНК и пирофосфоролиз, происходит при участии двух ионов магния, находящихся в активном центре РНКП (Sosunov et al, 2003). Однако необходима дальнейшая работа по проверке и совершенствованию этой модели.

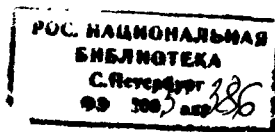
Кроме того, не изучены процессы в активном центре, предшествующие образованию фосфодиэфирной связи, и в этом направлении остается огромное поле для деятельности.

Понимание всех этих этапов в работе РНКП необходимо для выяснения механизма функционирования активного центра РНКП в целом.

Помимо чисто научного смысла, понимание функционирования активного центра РНКП несет в себе и практический интерес, особенно в случае бактериальной РНКП, поскольку его можно применить в разработке новых антибиотиков.

Цель работы и задачи исследования. Целью настоящей работы было изучение структурно-функциональной организации активного центра бактериальной РНКП. В задачи данного исследования входило:

1. Изучить механизм ингибирования РНКП антибиотиком стрептолидином, действующим на уровне активного центра.
2. На основе структурных и биохимических данных по ингибированию РНКП стрептолидином предложить общую схему функционирования активного центра РНКП.
3. Произвести проверку универсальной модели механизма катализа в активном центре РНКП с участием двух ионов двухвалентных металлов.



Научная новизна. В работе исследован механизм действия антибиотика стрептолидигина на бактериальную РНКП. Несмотря на то, что этот антибиотик известен уже очень давно (Siddhikol et al, 1969), до настоящего времени исследование механизма его действия детально не проводилось. При этом известно, что ингибирование РНКП стрептолидигином связано с его взаимодействием с активным центром РНКП (Severinov et al., 1995), поэтому исследование механизма ингибирования РНКП стрептолидигином представляло существенный интерес в понимании функционирования активного центра РНКП.

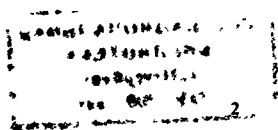
В настоящей работе впервые, с помощью структурных данных и биохимических исследований был детально изучен механизм действия стрептолидигина. Было показано, что стрептолидигин ингибирует РНКП по необычному механизму, когда РНКП, связанная со стрептолидигином, остается активной, но скорость реакций, осуществляемых РНКП, сильно снижена. Это первый пример описанного ингибитора РНКП, действующего таким образом, а не полностью инактивирующего РНКП при связывании с ней.

Кроме того, с помощью стрептолидигина впервые было получено свидетельство существования стадии рабочего цикла процесса элонгации, предшествующей синтезу фосфодиэфирной связи.

На основе результатов данной работы была предложена новая модель функционирования активного центра РНКП, в соответствии с которой нуклеотид связывается с ДНК, а потом переносится из так называемого “прединсерционного” в “инсерционный” сайт, где происходит синтез фосфодиэфирной связи.

При помощи мутагенеза была подтверждена недавно предложенная модель двуметаллического катализа образования фосфодиэфирной связи в активном центре. В этой модели два иона магния координированы в активном центре тремя консервативными остатками аспарагиновой кислоты. Показано, что каждый из трех остатков аспарагиновой кислоты участвует в акте катализа, а также впервые продемонстрировано, что нуклеиновые кислоты играют значительную роль в связывании Mg^{2+} в активном центре.

Практическое значение работы. Понимание каталитического механизма бактериальной РНКП расширяет горизонты для различных стратегий антибактериальной защиты. В частности, изучение действия стрептолидигина представляет большой интерес, так как этот антибиотик или его производные в



перспективе могут найти применение в клинической практике вообще и в борьбе с устойчивыми штаммами бактерий в частности

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на теоретическом семинаре отдела биоэнергетики НИИФХБ им.А.Н.Белозерского (Москва, 2005). Отдельные аспекты работы представлены на: 12th Biannual Meeting on Post-Initiation Activities of RNA Polymerases Mountain Lake, VA, USA November, 4-7, 2004 и Russian Bioenergetics. From Moleculls to Cells. Moscow February, 21-23 2005.

Публикации. Основные положения диссертации изложены в 4 печатных работах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 142 страницах машинописного текста и содержит 38 рисунков Библиография включает в себя 142 названия

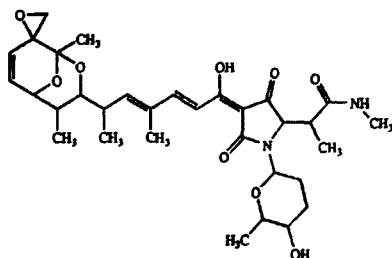
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа состоит из двух частей Первая часть посвящена изучению механизма действия ингибитора РНКП стрептолидигина и процессам, происходящим в активном центре, предшествующим синтезу фосфодиэфирной связи Вторая часть посвящена собственно механизму образования фосфодиэфирной связи в активном центре РНКП.

1. Изучение механизма действия стрептолидигина.

Одной из основных мишеней действия антибиотиков в бактериальной клетке является РНКП. Ингибирование РНКП антибиотиками связано с блокированием каких-либо важных стадий функционирования РНКП, что делает эти вещества мощным инструментом в исследовании механизма транскрипции. Антибиотик стрептолидигин (рис 1) ингибирует многие активности РНКП, такие как синтез РНК,

пирофосфоролит, внутреннее расщепление (Siddhikol et al., 1969, McClure, 1980). Несмотря на то, что стрептолидигин изучается уже около



может приблизить нас к пониманию функционирования активного центра РНКП. Так как наша работа посвящена исследованию активного центра РНКП, представляло большой интерес изучение механизма действия этого антибиотика.

Исследования механизма действия стрептолидигина проводили на РНКП термофильного микроорганизма *Thermus aquaticus*. Выбор объекта обусловлен двумя причинами. Во-первых, нами было показано, что эффект стрептолидигина гораздо сильнее выражен на РНКП *Thermus aquaticus*, нежели на РНКП *E.coli*. Во-вторых, в сотрудничестве с лабораторией Д. Васильева нами была получена кристаллическая структура комплекса РНКП близкородственного организма *Thermus thermophilus* со связанным с ней стрептолидигином, что давало возможность интерпретировать полученные результаты в терминах трехмерной структуры РНКП.

Для исследования механизма действия стрептолидигина был использован искусственный элонгационный комплекс, собранный на нуклеиново-кислотном остове (скаффолде), состоящем из 13-нуклеотидной РНК и 42-нуклеотидных матричной и нематричной цепей ДНК (рис 2). Последовательность ДНК этого элонгационного комплекса соответствует последовательности A1 промотора бактериофага T7 с -15 по +27 положения относительно точки старта транскрипции. Все эксперименты проводили при 40°C. При добавлении к элонгационному комплексу нуклеозидтрифосфата, комплементарного следующему положению матричной цепи, происходит удлинение РНК на один нуклеотид. Измеренная нами кажущаяся константа скорости (K_{obs}) элонгации при добавлении СТР в насыщающей концентрации составляет 3000 мин⁻¹.



Рис.2. Схема искусственного транскрипционного комплекса (скаффолда).

Вследствие высокой скорости реакции эти измерения проводили на быстром смесителе методом быстроостановленной реакции. В присутствии стрептолидигина эта реакция значительно замедлялась (рис 3) и ее измерения проводили вручную.

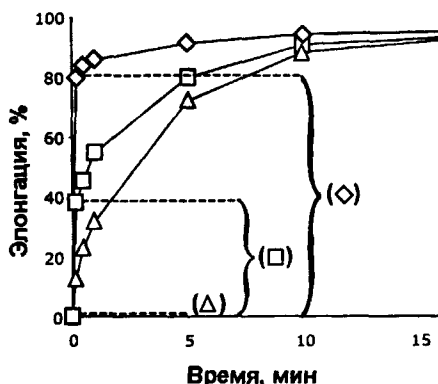
При попытке установить константу ингибирования стрептолидигином нами было замечено, что при небольших концентрациях стрептолидигина часть элонгационных комплексов остается активной, обладая той же скоростью элонгации, что и в отсутствие ингибитора (рис.4). Эта часть элонгационных комплексов

Время	0	5	10	20	50	100	250	500	3	0	10	1	5	10	30
	мсек	мсек	мсек	мсек	мсек	мсек	мсек	мсек	сек	сек	сек	мин	мин	мин	мин
[Стл], μ /мл	0									100					



Рис.3. Ингибирование стрептолидигином (Стл) одношаговой элонгации. Представлена кинетика присоединения СТР (1 mM) в отсутствие и в присутствии Стл (без Стл измерение проводилось на быстром смесителе методом быстроостановленной реакции, со стрептолидигином – вручную). Продукты реакций разделялись в денатурирующем ПААГ, показан радиоавтограф геля.

составляла так называемую быструю фракцию. Оставшаяся часть элонгационных комплексов (медленная фракция) обладала очень низкой скоростью присоединения



нуклеотида ($0,27\text{мин}^{-1}$), в 11000 раз ниже скорости быстрой фракции.

Рис.4. Разделение элонгационных комплексов на фракции в присутствии стрептолидигина (Стл). Приведены кинетики одношаговой элонгации в присутствии 1мM СТР при разных концентрациях Стл; Ромбы – без Стл, прямоугольники – Стл 5 мкг/мл, треугольники – Стл 100мкг/мл; фигурными скобками показана доля быстрой фракции для каждого из трех случаев.

Количество быстрой фракции напрямую зависело от концентрации стрептолидигина в реакции. Это позволило предположить, что медленную фракцию составляют элонгационные комплексы, связанные со стрептолидигином, тогда как быстрая фракция соответствует элонгационным комплексам, свободным от стрептолидигина. Тот факт, что элонгационные комплексы медленной фракции все же обладали активностью, можно было объяснить двумя причинами: (1) В медленной фракции стрептолидигин находится в равновесии с элонгационным комплексом, полностью инактивируя его при связывании с ним. При диссоциации же

стрептолидигина активность элонгационного комплекса возвращается в исходное состояние (2) Стрептолидигин, связываясь с элонгационным комплексом, приводит не к полной инактивации, а к сильному замедлению активности РНКП

Если верно первое предположение, то увеличение концентрации стрептолидигина в реакции должно приводить к уменьшению скорости медленной фракции. Однако нами было показано, что скорость медленной фракции не зависит от концентрации антибиотика в реакции, что свидетельствует в пользу предположения, что стрептолидигин замедляет активность РНКП

Данное предположение нам также удалось подтвердить с помощью использования ионов марганца в качестве каталитического металла РНКП. Оказалось, что ионы марганца сильно увеличивают скорость медленной фракции элонгационных комплексов, при этом практически не влияя на быструю фракцию. Присутствие 5 мМ Mn^{2+} по сравнению с 10 мМ Mg^{2+} активировало медленную фракцию в 13 раз (рис 5,

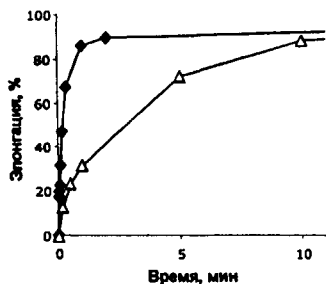


табл 1) При проведении реакции в отсутствие стрептолидигина, наличие 5 мМ Mn^{2+} не оказывало активирующего действия, напротив, даже приводило к слабому ингибированию (в 2 раза) (табл. 1).

Рис.5. Графики кинетик элонгации в присутствии 100мкг/мл стрептолидигина в присутствии ионов магния или марганца. Треугольники — в присутствии 10мМ Mg^{2+} ; ромбы — в присутствии 5мМ Mn^{2+} .

Так как этот эффект может объясняться тем, что присутствие ионов марганца может влиять на связывание стрептолидигина, мы измерили концентрации полунингибирования в присутствии ионов магния и марганца. Концентрации полунингибирования стрептолидигином были рассчитаны по измеренной зависимости количества быстрой фракции от концентрации стрептолидигина, и соответствовали его концентрации, при которой доля быстрой фракции составляет 50%. Эти значения оказались равными в присутствии Mn^{2+} и Mg^{2+} и составляли 8,3 мкг/мл стрептолидигина.

Таким образом, полученные данные подтверждают то, что быстрая фракция элонгационных комплексов соответствует РНКП, не связанной со стрептолидигином, и свидетельствуют в пользу того, что РНКП, связанная со стрептолидигином, активна, хотя ее скорость элонгации сильно замедлена.

Еще одно доказательство было получено при использовании медленно расщепляемого аналога СТР *цитидин-5'-О-(1-тиотрифосфата)* (тиоСТР) в качестве субстрата (Polesky et al., 1992; Kaushik et al., 1996). Оказалось, что включение этого модифицированного нуклеозидтрифосфата РНК-полимеразой происходит в 1250 раз медленнее по сравнению с нормальным нуклеозидтрифосфатом. С другой стороны,

Табл 1. Влияние ионов металлов и субстратов на скорости одношаговой элонгации

А			
Субстрат	Стл	k_{obs} , мин ⁻¹	
		Mg ²⁺	Mn ²⁺
СТР	-	3000	1500
тиоСТР	-	2,4	12
СТР	+	0,27	3,6
тиоСТР	+	0,012	0,72

Б			Кратность	
			Mg ²⁺	Mn ²⁺
(СТР – стл):(тиоСТР – стл)			1 250	125
(СТР + стл):(тиоСТР + стл)			22,5	5
(СТР – стл):(СТР + стл)			11 000	417
(ТеоСТР – стл):(ТеоСТР + стл)			200	17
(СТР – стл):(тиоСТР + стл)(двойное ингибир.)			250 000	2 000

В		
Субстрат	Стл	Кратность Mn ²⁺ /Mg ²⁺
СТР	-	0,5
СТР	+	13
тиоСТР	-	5
тиоСТР	+	60

в присутствии стрептолидигина реакция замедлялась всего в 125 раз. Таким образом, ингибирующий эффект стрептолидигина уменьшается в присутствии ионов марганца и при использовании тию-аналога нуклеозидтрифосфата в качестве субстрата (Табл.1). Это указывает на различие свойств элонгационных комплексов медленной и быстрой фракций и подтверждает гипотезу о том, что РНКП, связанная со стрептолидигином, активна. Причины различий в свойствах элонгационных комплексов медленной и быстрой фракций мы рассмотрим ниже.

РНКП обладает способностью расщеплять фосфодиэфирную связь в транскрипте при движении назад (процессе бэктрэкинга) Мы проверили способность стрептолидигина подавлять эту реакцию. Оказалось, что стрептолидигин ингибирует внутреннее расщепление, при этом также наблюдается разделение на медленную и

быструю фракции (рис 6) Также как и для элонгации, для внутреннего расщепления была показана активация медленной фракции в присутствии ионов марганца, тогда как они практически не оказывали влияния на расщепление в отсутствие стрептолидигина

Интересно отметить, что концентрация полуингибирования стрептолидигином внутреннего расщепления была в 5 раз ниже таковой в случае элонгации и составляла

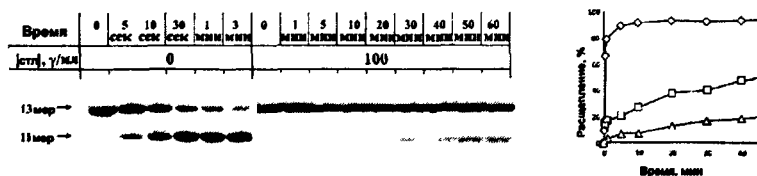


Рис.6. Стрептолидигин ингибирует внутреннее расщепление. Приведен радиоавтограф геля (слева), в котором разделялись продукты реакции внутреннего расщепления 13-мера РНК до 11-мера в отсутствие и в присутствии стрептолидигина. Реакция проводилась в присутствии 10 mM MgCl₂. Справа приведены графики кинетик расщепления в разных концентрациях стрептолидигина. Ромбы- без Стл, прямоугольники - Стл 5 мкг/мл, треугольники - Стл 100 мкг/мл

1,7мкг/мл. По-видимому, это свидетельствует о разных конформациях активного центра в сдвинутом назад (бэктрэкинг) и активном комплексах (см. ниже)

Таким образом, наши данные показывают, что стрептолидигин ингибирует РНКП по необычному механизму, когда РНКП, связанная со стрептолидигином, остается активной, но скорость реакций, осуществляемых РНКП, сильно снижена. Это первый пример описанного ингибитора РНКП, действующего таким образом, а не полностью инактивирующего РНКП при связывании с ней.

Замедление реакции элонгации может объясняться увеличением K_m для входящего нуклеотида. Мы измерили K_m для входящего нуклеозидтрифосфата (СТР) в отсутствие и в присутствии стрептолидигина. Измерения K_m со стрептолидигином проводили при высокой концентрации ингибитора (100 мкг/мл, 150 мкМ), при которой доля быстрой фракции была пренебрежимо мала, что дало возможность избежать возможных ошибок, связанных с присутствием быстрой фракции. При этой же концентрации стрептолидигина проводили и другие эксперименты по изучению свойств медленной фракции элонгационных комплексов. Кажущаяся K_m для входящего нуклеозидтрифосфата в отсутствие стрептолидигина оказалась равной 68 мкМ, что согласуется с литературными данными (Foster et al., 2001), а в присутствии 100 мкг/мл стрептолидигина, когда доля быстрой фракции составляет менее 1%, K_m

для входящего нуклеотида практически не менялась, составляя 61 мкМ (рис.7). Таким образом, ингибирование стрептолидигином не связано с изменением сродства РНКП к субстрату.

Тио-аналог нуклеозидтрифосфата *цитидин-5'-О-(1-тиотрифосфат)* замедляет скорость синтеза фосфодиэфирной связи. Этот эффект ранее был исследован на ДНК-полимеразах (Polesky et al., 1992; Kaushik et al., 1996), для которых тио-аналог не

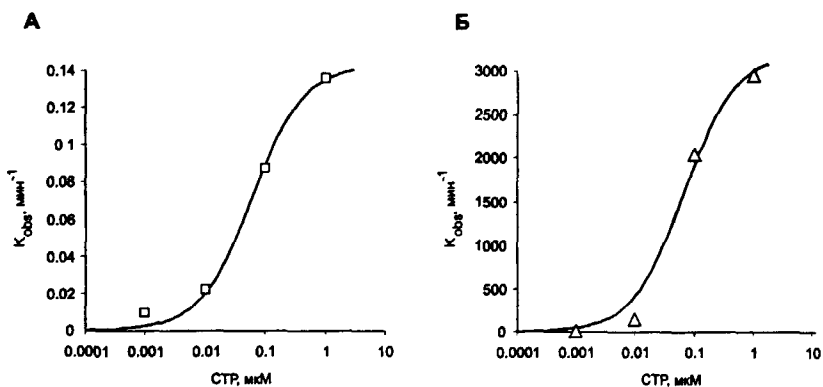


Рис.7. Графики зависимости K_{obs} (кажущейся константы скорости реакции одношаговой элонгации) от концентрации СТР в логарифмических координатах. А) в присутствии 100 мкг/мл стрептолидигина (медленная фракция) и Б) в отсутствие стрептолидигина. Полученные значения K_m 61 мкМ – в присутствии стрептолидигина, в отсутствие стрептолидигина - 68 мкМ

приводил к замедлению элонгации. Это было объяснено тем, что лимитирующей стадией в синтезе, осуществляемом ДНК-полимеразой, является конформационный переход, предшествующий синтезу фосфодиэфирной связи. Сильное замедление элонгации РНКП в присутствии тио-аналога (в 1250 раз), по-видимому, указывает на то, что синтез фосфодиэфирной связи является лимитирующей стадией, или, по крайней мере, не сильно отличающейся по скорости от других возможных стадий элонгации. Гораздо меньший эффект тио-аналога на элонгацию РНКП, связанной со стрептолидигином (замедление в 125 раз) (табл 1), свидетельствует в пользу того, что стрептолидигин замедляет какую-то стадию, предшествующую синтезу фосфодиэфирной связи, делая эту стадию лимитирующей. Это является первым свидетельством существования некой стадии, предшествующей синтезу фосфодиэфирной связи.

Таким образом, ингибирование стрептолидигином не определяется связыванием субстрата (т.к. значение K_m не меняется) и синтезом фосфодиэфирной связи как таковым, а происходит на этапе, находящемся между этими двумя стадиями

Для дальнейшего понимания механизма действия стрептолидигина на РНКП в сотрудничестве с лабораторией Д. Васильева нами была получена кристаллическая структура РНКП *Thermus thermophilus* со связанным с ней стрептолидигином (Vassilyev et al, submitted).

На кристаллической структуре с разрешением в 2,4 Å видно, что сайт связывания молекулы стрептолидигина находится на расстоянии 20 Å от активного центра (места синтеза фосфодиэфирной связи). Стрептолидигин связывается вдоль F-спирали (bridging helix), которая находится между местом расхождения двойной цепи ДНК и местом образования ДНК-РНК гибрида. Связанная молекула стрептолидигина также изменяет обычное положение G-петли.

Из сравнения структур РНК-полимераз видно, что F-спираль может принимать 2 конформации – согнутую и прямую (Zhang et al., 1999; Vassilyev et al., 2002). Биохимические данные свидетельствуют о важности в функционировании РНКП движения системы G-петля – F-спираль (Vassilyev et al., 2002; Bar-Nahum et al., 2005; Epshtein et al., 2002), однако механизм этого не ясен. В структуре РНКП со стрептолидигином F-спираль находится в прямой конформации, и стрептолидигин может блокировать движение F-спирали и приводить к ингибированию РНКП. Так как наши данные указывают на то, что стрептолидигин ингибирует некую стадию, предшествующую синтезу фосфодиэфирной связи, можно предположить, что именно изгибание F-спирали и является этой стадией. Из наших данных также следует, что это конформационное изменение необходимо и для эффективного осуществления реакции внутреннего расщепления. Наши данные по активации синтеза и расщепления в присутствии ионов марганца свидетельствуют в пользу того, что в комплексе РНКП-стрептолидигин α -фосфат входящего нуклеозидтрифосфата, а также фосфодиэфирная связь РНК при сдвиге назад (процессе бэктрэкинга), находятся в неблагоприятном положении относительно каталитического иона магния для эффективного осуществления реакции. Так как ион марганца обладает более сильными координационными связями по сравнению с ионами магния, его связывание в активном центре может физически притягивать необходимые химические группы к активному центру, тем самым переводя их в реакционноспособное состояние. Таким образом, на основе полученных нами данных мы предполагаем, что изменение

конформации F-спирали переводит связанный нуклеозидтрифосфат или нуклеотид РНК, находящийся в активном центре при сдвиге назад (бэктракинге) в активное состояние, когда может осуществляться синтез или расщепление фосфодиэфирной связи. В недавно опубликованной кристаллической структуре элонгационного комплекса эукариотической РНКП с входящим нуклеозидтрифосфатом (Kettenberger et al., 2004) видно, что нуклеозидтрифосфат находится в конформации, при которой невозможно осуществление каталитического синтеза фосфодиэфирной связи. В этой конформации нуклеозидтрифосфат спарен с основанием дезоксирибонуклеотида матричной цепи и располагается вдоль F-спирали, которая в этой структуре находится в выпрямленной конформации. Авторы статьи предполагают, что это состояние нуклеозидтрифосфата является так называемым прединсерционным (предвставочным), и необходима подвижка этого нуклеозидтрифосфата в инсерционное (вставочное) состояние для осуществления акта катализа, т.е. образования фосфодиэфирной связи РНК.

Принимая в рассмотрение полученные нами данные, мы предполагаем, что именно изменение конформации F-спирали из прямой в согнутую и переводит нуклеозидтрифосфат из прединсерционного в инсерционное положение. Таким образом, по этой гипотезе стрептолидигин, связываясь с F-спиралью и блокируя ее

движение, препятствует передвижению нуклеозидтрифосфата из прединсерционного в инсерционное состояние (рис.8). С помощью этой модели можно объяснить, почему стрептолидигин не полностью ингибирует РНКП, а лишь замедляет ее активность. Так как изменение конформации F-спирали, по-видимому, приводит к понижению энергетического барьера

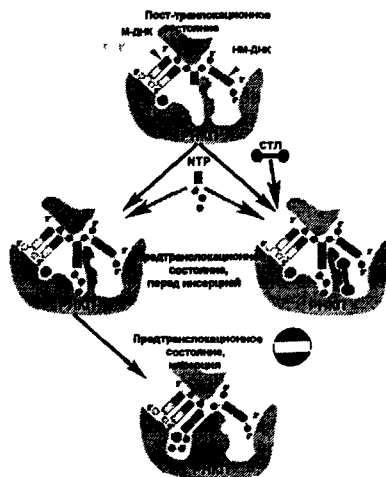


Рис.8. Модель функционирования активного центра РНКП и механизм действия стрептолидигина. В активном центре показан ион Mg^{2+} . НМ-ДНК и М-ДНК – нематричная и матричная цепи ДНК соответственно

перехода нуклеозидтрифосфата из прединсерционного в инсерционное состояние, блокирование этого процесса приводит лишь к уменьшению вероятности преодоления энергетического барьера, и как следствие, к замедлению скорости

Полученные в настоящей работе данные позволяют построить модель функционирования активного центра РНКП (рис.8). При выпрямленной конформации F-спирали входящий нуклеозидтрифосфат, комплементарный следующему за 3' концом РНК основанию матричной цепи ДНК, образует водородные «Уотсон-Криковские» связи с этим основанием в регистре (n) и связывается в прединсерционном сайте РНКП. При этом 3'-конец РНК находится в регистре (n-1) (посттранслокационное состояние). Наличие прединсерционного сайта увеличивает точность синтеза, так как увеличивает время для отбора правильного нуклеозидтрифосфата. Изгибание F-спирали «толкает» нуклеозидтрифосфат из прединсерционного сайта в инсерционный. В инсерционном сайте трифосфатная группировка нуклеозидтрифосфата располагается таким образом, что возможно осуществление нуклеофильной атаки 3'-ОН группой нуклеотида транскрипта альфа-фосфатной группы входящего нуклеозидтрифосфата. Происходит образование фосфодиэфирной связи, после чего спаренный с основанием ДНК 3'-конец РНК находится в регистре (n) (претранслокационное состояние). Затем происходит акт транслокации, который возвращает 3'-конец РНК в посттранслокационное состояние.

При сдвиге назад (бэктрекинге), при согнутом состоянии F-спирали нуклеотид РНК занимает инсерционный сайт, в котором фосфодиэфирная связь расположена должным образом для эффективного осуществления внутреннего расщепления. При прямой же конформации F-спирали, как в комплексе РНКП со стрептолигидином, нуклеотид РНК занимает прединсерционное положение или близкое к нему. В этом состоянии фосфодиэфирная связь удалена от иона магния активного центра, что приводит к невозможности осуществления внутреннего расщепления.

Таким образом, изучение механизма ингибирования РНКП стрептолигидином доказало существование прединсерционного сайта связывания нуклеотида, и привело нас к построению модели функционирования активного центра РНКП.

2. Изучение роли триады остатков аспарагиновых кислот в думеталлическом каталитическом механизме РНКП.

Думеталлический механизм катализа постулирован для всех клеточных РНК-полимераз (Sosunov et al, 2003). При этом один из ионов Mg^{2+} прочно связан в активном центре фермента, а другой приносится в активный центр вместе с субстратом. Предполагается, что консервативная триада остатков аспарагиновой кислоты участвует в каталитическом механизме многосубъединичной клеточной РНКП (Sosunov et al, 2003). Аспартаты содержатся в инвариантном мотиве DFDGD в большей (β') субъединице РНКП. Исходно определяющая роль триады в координации каталитического Mg^{2+} предполагалась на основании данных, полученных при исследовании мутанта с тройной заменой аспартатов на аланин (Zaychikov et al., 1996). РНКП с этими мутациями образует стабильные открытые промоторные комплексы, которые, однако, каталитически неактивны (Zaychikov et al., 1996). В кристаллической структуре мотив DFDGD является частью гибкой петли, которая прикреплена к жесткому домену β -складки (Рис. 9). Петля проникает в активный центр РНКП и в соответствии с биохимическими данными хелирует двухвалентный ион металла (Me^{2+}) (Zhang et al, 1999; Gnatt et al, 2001). Как ожидалось, РНКП, имеющая тройную замену на аланин была неспособна к удержанию Me^{2+} в активном центре (Zaychikov et al, 1996), что объясняет потерю каталитической активности.

В целях представления структурной модели полимеризации РНК многосубъединичными РНКП (Sosunov et al., 2003) использовалось молекулярное моделирование. В этой модели три остатка аспарагиновой кислоты из мотива DFDGD принимают участие в координации двух ионов Mg^{2+} (Рис. 9 Б). Два карбоксилата (Asp^{460} и Asp^{462} , нумерация по *E.coli*) связывают оба иона, в то время как третий (Asp^{464}) взаимодействует только с одним ионом Mg^{2+} . Этот ион дополнительно координируется 3'-гидроксилом 3'-концевого нуклеотида РНК и кислородом α -фосфата нуклеозидтрифосфата (НТФ), который обеспечивает атаку по линии 3'-гидроксильной группы на α -фосфате. Второй ион магния, Mg^{2+} II, контактирует с тремя кислородами трифосфатной группы субстрата, таким образом стабилизируя пентакоординированный интермедиат и нейтрализуя развивающийся отрицательный заряд на оставшейся пирофосфатной группе. Предсказанные положения двух ионов Mg^{2+} в дрожжевой РНКП II были недавно подтверждены структурным анализом высокого разрешения (Westover et al., 2004).

В тройном элонгационном комплексе (ТЭК) в дополнение к прямой реакции полимеризации многосубъединичная РНКП осуществляет обратную реакцию пиррофосфоролита, а именно 3'-5' гидролиз зарождающейся РНК и внутреннее расщепление РНК, которое стимулируется специальными факторами (названными Gre факторами в эубактериях, (Borukhov et al., 2001, Opalka et al., 2003; Kettenberger et al., 2004; Kettenberger et al., 2003). В нашей модели все эти реакции осуществляются в одном активном центре с участием двух ионов Mg^{2+} (Sosunov et al., 2003). В этом исследовании мы задались целью проверить основные постулаты модели путем

изучения эффектов индивидуальных замен остатков Asp в мотиве DFDGD РНКП *E.coli*.

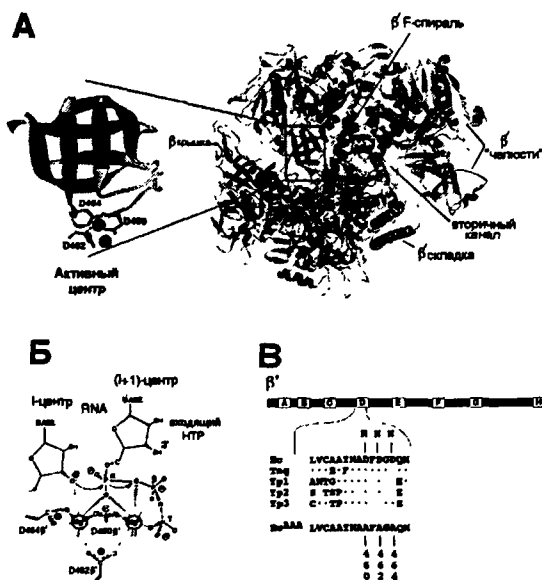


Рис.9. Активный центр многосубъединичной РНКП. А. Архитектура активного центра РНКП. Изображен кор-фермент *Taq* РНКП вместе с увеличенным доменом активного центра (в виде ленты). Показаны главные структурные черты РНКП.

Б. Два иона Mg^{2+} координированы тремя остатками Asp (пронумерованы для β' субъединицы РНКП *E.coli*). Стрелками показано направление переноса электронной плотности при реакции полимеризации [1].

В. Линия схематически представляет β' субъединицу длиной 1407 аминокислот в *E.coli*. Буквенные прямоугольники показывают эволюционно консервативные регионы последовательности. Фрагмент эволюционно

консервативного сегмента D первичной последовательности (в однобуквенном коде) расширяется внизу и выравнен по гомологичным последовательностям из *T.aquaticus* (*Taq*) и дрожжевой РНКП I, II и III (Yr1, Yr2 и Yr3 соответственно). Три точечные замены, анализируемые в этой работе, D460N, D462N и D464N, показаны над последовательностью *E.coli*. Последовательность тройной аланиновой замены, изученной ранее (Zaychikov et al., 1996), показана под выравниванием.

Для исследования роли индивидуальных остатков Asp в мотиве DFDGD были сделаны точечные мутации, заменяющие остатки аспарагиновой кислоты Asp⁴⁶⁰, Asp⁴⁶² и Asp⁴⁶⁴ на остатки аспарагина (Asn) (Рис.9 В). Выбор замен был продиктован

нашим желанием уменьшить способность связывания металла, в то же время сохраняя общую геометрию остатков. Мутантная РНКП была реконструирована из индивидуальных суперэкспрессированных субъединиц и очищена по опубликованной процедуре (Borukhov and Goldfarb, 1993). Мутантные ферменты были совершенно неактивны в реакции abortивной инициации, равно как и в реакции синтеза полноразмерной РНК на промоторе T7A1 в условиях, когда контрольный фермент дикого типа (ДТ) был высокоактивным (Рис.10). Эксперименты по замедлению в геле и пробированию с помощью $KMnO_4$ выявили, что мутантные ферменты в состоянии распознавать, связываться и открывать промотор T7A1 так же эффективно, как это делает ДТ РНКП. Мы сделали вывод, что каждый их трех Asp остатков в мотиве

DFDGD необходим для промотор-

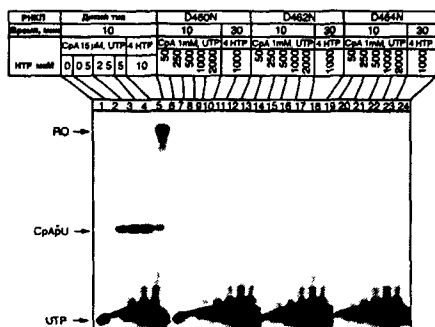
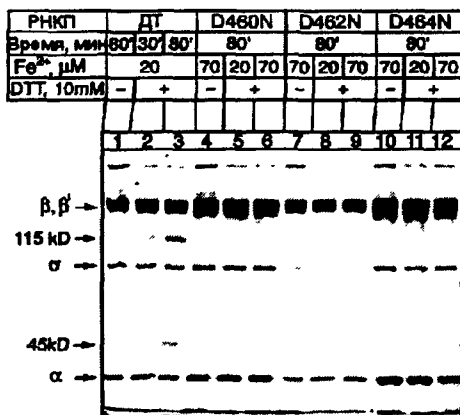


Рис.10. In vitro транскрипция с участием дикого типа (ДТ) РНКП и мутантной РНКП. На представленном радиоавтографе геля - результаты транскрипции in vitro (abortивного синтеза) ДТ и мутантных РНКП с фрагмента ДНК, содержащего промотор T7A1. В случае фермента ДТ наблюдается образование триплексида SrArU при добавлении к открытому комплексу РНКП радиоактивно-меченого УТР и динуклеотида СрА (полосы 2-4); при добавлении смеси четырех НТР, содержащих радиоактивно меченый УТР наблюдается образование полноразмерного продукта (RO (runoff), полоса 5). В случае мутантных ферментов активность отсутствует (полосы 6-24)

зависимой транскрипции холо-ферментом РНКП *E. coli*. Для проверки влияния индивидуальных замен Asp на связывание двухвалентных металлов в активном центре мы использовали метод Fe^{2+} -опосредованного расщепления белка. Этот подход использует способность ионов Fe^{2+} связываться в активном центре вместо Mg^{2+} с расщеплением близлежащих сайтов в белке генерируемыми радикалами гидроксил аниона (Zaychikov et al., 1996). Инкубация ДТ РНКП в присутствии 20 мкМ Fe^{2+} вызывала появление полипептидов ~115 и ~45 кДа (Рис.11, полоса 2), которые являются продуктами расщепления β' -субъединицы в мотиве DFDGD (Zaychikov et al., 1996). Как и ожидалось, расщепление происходило только в присутствии DTT (Рис.11,полоса 3), то есть зависело от гидроксил анион радикалов. Когда мутантные



ферменты находились в условиях, оптимальных для Fe²⁺ - зависимого расщепления, даже в

Рис. 11. Fe²⁺-опосредованное аффинное расщепление ДТ и мутантных РНКП. РНКП была подвержена Fe²⁺-опосредованному аффинному расщеплению в присутствии различных концентраций Fe²⁺ для указанных промежутков времени. Реакционные продукты были разделены в SDS ПААГ и выявлены окраской Кумасси Синим.

присутствии 70 мкМ Fe²⁺ расщепления не наблюдалось (Рис 11, полосы 6, 9 и 12) Из этого мы сделали вывод, что замена любого из трех остатков Asp в мотиве DFDGD влияет на связывание Me²⁺ со свободной РНКП. Таким образом, РНКП, несущая одиночную замену аспартата в мотиве DFDGD, ведет себя схожим образом с ранее описанной РНКП, несущей тройную замену Asp-Ala в мотиве (Zaychikov et al., 1996).

Так как в мутантных РНКП полностью отсутствовали активности в стандартных промотор-зависимых условиях, мы использовали искусственные транскрипционные комплексы, собранные на синтетических нуклеиново-кислотных остовах (скаффолдах), которые воспроизводят архитектуру нуклеиновых кислот в элонгационном комплексе (рис.2) (Sidorenkov et al., 1998; Korzheva et al., 1998) Данная система позволяет прямо исследовать реакции, характерные для ТЭК, минуя сложные реакции, вовлеченные в инициацию транскрипции ДНК - компонент скаффолда, используемый в наших экспериментах, базировался на последовательности промотора T7A1. Мы специально выбрали этот скаффолд, так как соответствующий природный ТЭК особенно склонен к реакциям внутреннего расщепления и пирофосфоролита.

РНКП, образующая комплекс с нуклеиново-кислотным скаффолдом, обладает каталитической активностью, типичной для природного ТЭК (Рис. 12 А). Как можно видеть, начальный РНК - продукт 13А (полоса 1) был удлинен до 14С в присутствии СТР (полоса 3) и до более длинных продуктов в присутствии всех четырех НТР (полоса 4).

Добавление пирофосфата вызывало процессивную деградацию 13А РНК (полоса 5) Инкубация в отсутствие НТР в присутствии Mg^{2+} приводила к укорочению 13А РНК до 11А вследствие внутренней активности эндонуклеотического расщепления каталитического центра РНКП (полоса 2), причем эта активность была стимулирована белковыми факторами расщепления транскрипта, GreA и GreB (полосы 6 и 7)

Надо отметить, что фактор-зависимое расщепление в скаффолдовых комплексах требовало стехиометрических количеств факторов расщепления. Это не согласуется с данными, полученными на природных элонгационных комплексах, где требовались большие количества Gre (Borukhov et al, 1993). Причина этого различия на данный момент неизвестна, но она может быть вызвана более сильным связыванием факторов Gre с искусственно собранными ТЭК.

Все три мутанта с Asp/Asn заменами были проверены на их способность удлинять 13А РНК на скаффолде и результаты этой проверки представлены на Рис 12 Б. Как можно видеть, все три мутанта были способны к полимеризации РНК в этой

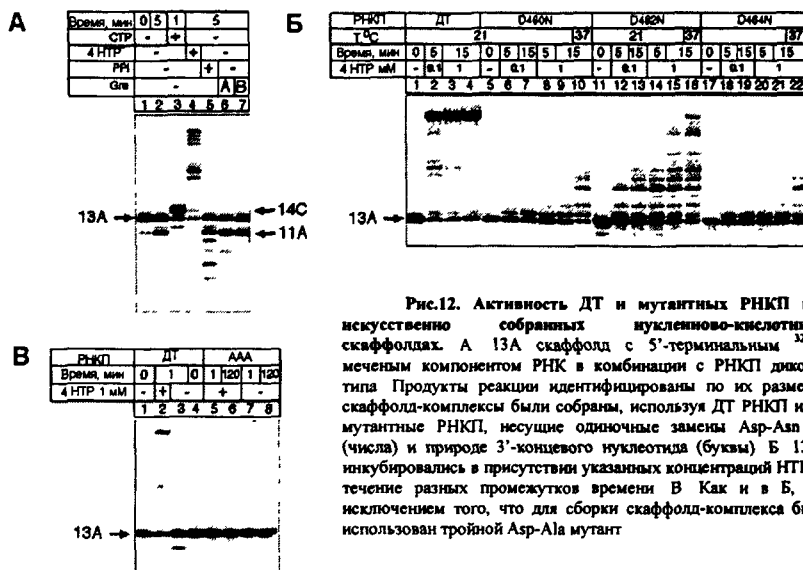


Рис.12. Активность ДТ и мутантных РНКП на искусственно собранных нуклеино-кислотных скаффолдах. А 13А скаффолд с 5'-терминальным ^{32}P -меченым компонентом РНК в комбинации с РНКП дикого типа. Продукты реакции идентифицированы по их размеру скаффолд-комплексы были собраны, используя ДТ РНКП или мутантные РНКП, несущие одиночные замены Asp-Asn и (числа) и природе 3'-концевого нуклеотида (буквы) Б 13А инкубировались в присутствии указанных концентраций НТР в течение разных промежутков времени В Как и в Б, за исключением того, что для сборки скаффолд-комплекса был использован тройной Asp-Ala мутант

системе. Мутант D462N был самым активным (полосы 11-16). Активность полимеризации РНК мутантными ферментами увеличивалась по мере возрастания

концентрации НТР и при повышении температуры (сравним, например, полосы 13 и 15 и полосы 15 и 16 соответственно). Однако даже при 37°C и в присутствии 1 мМ НТР ни один из мутантов не был в состоянии полностью удлинить 13А РНК до полноразмерного продукта. Напротив, РНКП дикого типа (ДТ) быстро удлиняла 13А РНК до полноразмерного продукта в присутствии 100 мкМ НТР при 21°C (сравним полосы 1 и 2). Активность мутантных РНКП не могла быть объяснена наличием загрязнения от ДТ РНКП, так как загрязняющий фермент должен был полностью удлинять 13А транскрипт. Поэтому мы сделали вывод, что мутантный фермент может удлинять РНК в нуклеиново-кислотном скаффолде. По сравнению с ДТ РНКП, элонгация мутантным ферментом происходит очень медленно.

Используя нуклеиново-кислотные скаффолды, была также проверена активность ранее описанного тройного Asp-Ala мутанта (Рис. 12 В). В отличие от мутанта с одиночной заменой, тройной мутант был полностью неактивен даже при инкубации в течение нескольких часов (Рис. 37 В, полоса 8).

Мы не можем сделать каких-либо выводов о природе сильного дефекта, наблюдаемого в мутантах с одиночными заменами в проведении прямой реакции синтеза РНК, на основании экспериментов, представленных на Рис. 12 В, так как фермент дикого типа осуществляет реакцию крайне быстро (при 37°C в присутствии 1 мМ НТР, то есть в условиях, при которых мутантные ферменты не полностью удлиняли 13А РНК даже после 15 мин инкубации, фермент дикого типа завершал реакцию за несколько секунд). Более того, элонгация 13А РНК мутантными ферментами приводит к появлению множественных продуктов элонгации, делая трудным количественный анализ. Для преодоления этих проблем мы изучали элонгацию 13А РНК в присутствии СТР, который позволяет продвинуться лишь на один шаг. Медленная реакция добавления нуклеотида мутантным ферментом изучалась вручную; быстрая реакция ДТ РНКП изучалась в реальном времени, методом быстроостановленной реакции с использованием быстрого смесителя.

Для определения констант скоростей и значений кажущихся K_m (для СТР как субстрата), переход 13А в 14С был исследован как функция времени и концентрации СТР (последняя варьировала в пределах от 1 мкМ до 2 мМ). Кажущиеся константы скорости для ДТ РНКП и трех мутантов при насыщающих (2 мМ) концентрациях СТР представлены в Табл. 2. Как можно видеть, замены в мотиве DFDGD приводили к сильному уменьшению скорости присоединения нуклеотидов. Построение зависимости скоростей реакции от концентрации СТР позволило получить значения кажущейся K_m .

Замена в мотиве DFDGD незначительно меняет значения кажущейся K_m , которые колебались в пределах от 25 мкМ (D460N) до 200 мкМ (D464N), при этом в ДТ РНКП наблюдалось промежуточное значение (100 мкМ). Ясно, что эти незначительные различия не могут объяснить сильного различия в скоростях реакции между мутантными ферментами и ферментом дикого типа.

Возникло предположение, что сильные каталитические дефекты, проявляемые в мутантных ферментах вызваны их неспособностью связывать каталитический Mg^{2+} . Для проверки этой идеи мы определили влияние разных концентраций Mg^{2+} на реакцию одношагового удлинения 13A РНК. Для того, чтобы избежать хелирования Mg^{2+} нуклеозидтрифосфатом, эксперимент был выполнен при низкой концентрации СТР. Результаты показывают, что выше 5 мМ Mg^{2+} не наблюдалось значительной стимуляции и что в относительных терминах, мутантные и ферменты дикого типа сходно отвечали на изменение концентрации Mg^{2+} (Рис 13).

Результат указывает на то, что в нуклеиново-кислотном скаффолде замена Asp – Asp приводит к небольшому (<5 раз) эффекту на связывание Mg^{2+} , кроме того стандартный реакционный буфер содержал 10мМ Mg^{2+} , поэтому сильный каталитический дефект, наблюдаемый в мутантных ферментах не может быть вызван ослаблением связывания Mg^{2+} .

Известно, что Mn^{2+} может замещать Mg^{2+} при транскрипции (Rhodes et al., 1974). Анализ ДНК полимераз с мутациями в активном центре показывает, что активность некоторых мутантов может быть восстановлена заменой иона Mg^{2+} в реакционном буфере на Mn^{2+} (Copeland and Wang, 1993; Saturno et al., 1998; Pritchard et al., 1998), по-видимому, вследствие того, что большего размера ион Mn^{2+} лучше удерживается в активном центре или того, что ориентацию иона Mn^{2+} сложнее изменить с помощью мутации в активном центре. Поэтому мы проверили влияние Mn^{2+} на превращение

комплекса 13A в 14C.

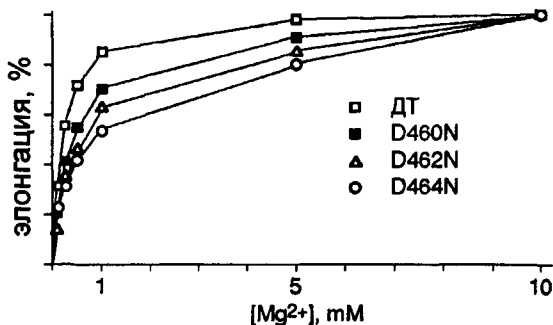


Рис.13. Скорость элонгации мутантных и ДТ РНКП при различных концентрациях Mg^{2+} . Реакция одношаговой элонгации была выполнена в присутствии 1 мкМ СТР и указанных концентраций Mg^{2+} . Для каждого фермента скорость элонгации 13A РНК в присутствии 10 мМ Mg^{2+} была взята равной 100%

Замена Mg^{2+} на Mn^{2+} имеет слабый эффект на ДТ РНКП, но сильно стимулирует мутантные ферменты (Табл.2). Однако, даже в присутствии насыщающих концентраций Mn^{2+} каталитическая активность мутантных РНКП была существенно ниже по сравнению с активностью ДТ РНКП. Поэтому мы делаем вывод, что насыщающие концентрации ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} не в состоянии восстановить ферментативную активность мутанта.

Так как мутантные ферменты образуют активные комплексы с нуклеиново-кислотным скаффолдом, мы исследовали влияние замены Asp на скорость пиррофосфоролиза (оцененного по скорости накопления множественных продуктов пиррофосфоролиза, см. Рис. 12 А, полоса 5), внутреннее расщепление РНК (оцененное по скорости накопления полосы 11 А, см. Рис. 12 А, полоса 2) и фактор Gre-зависимое расщепление (оцененное из скорости накопления полосы 11 А, Рис. 12 А, полосы 6 и 7). Так как реакции расщепления, выполняемые ферментом дикого типа, относительно медленные, характеристические константы скоростей могут быть определены из экспериментов по временной зависимости вручную. Результаты, которые суммированы в Табл. 2, показывают, что деградация РНК сильно уменьшается при всех трех заменах. Однако каждая замена приводит к различной степени остаточной деградационной активности. Например, замена Asp^{464} уменьшает внутреннее расщепление ниже порога чувствительности метода, в то время как замены в Asp^{460} и Asp^{462} дают измеряемые уровни расщепления. Любопытно, что хотя Mn^{2+} стимулировал прямую реакцию мутантных ферментов больше чем для ДТ РНКП, обратное наблюдалось для внутренней реакции расщепления, что в относительных терминах означает, что дефект мутантного фермента увеличивался в присутствии Mn^{2+} (Табл.2). Что касается Gre фактор-зависимого расщепления зарождающейся РНК, только мутант Asp^{464} , в котором не представлялось возможным детектировать активность внутреннего расщепления, стимулировался GreA (Табл 2). Однако даже в присутствии фактора скорость расщепления транскрипта мутантным ферментом все же остается более медленной по сравнению с ДТ РНКП. Из этих данных мы делаем вывод, что замены в мотиве DFDGD влияют не только на прямую реакцию синтеза РНК, но и на обратную реакцию пиррофосфоролиза и внутреннюю реакцию эндонуклеотического расщепления. Этот результат находится в согласии с моделью, которая постулирует, что все виды известных каталитических активностей РНКП определяются ионами Mg^{2+} , связанными в одном и том же каталитическом центре (Sosunov et al., 2003).

Табл.2. Константы скоростей реакций, катализируемых ДТ и мутантными РНКП.

	РНКП ^{ДТ}	РНКП ^{Δ60N}	РНКП ^{Δ62N}	РНКП ^{Δ64N}
1. Элонгация (2 mM CTP, 10 mM Mg ²⁺)	3500	0.06	1.4	0.7
<i>ДТ мутант</i>		58,000	2,500	5,000
Mn ²⁺ /Mg ²⁺ **	1.25	75	20	50
2. Пирофосфоролит (1 mM PPi, 10 mM Mg ²⁺)	0.8	7x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
<i>ДТ мутант</i>		1100	1000	8000
3. Внутреннее расщепление (10 mM Mg ²⁺)	0.14	7x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ **
<i>ДТ мутант</i>		200	700	1400
Mn ²⁺ /Mg ²⁺	12	6	6	<3
4. GreA расщепление	0.93	2x10 ⁻³	2x10 ⁻⁴	3.7x10 ⁻³
<i>ДТ мутант</i>		460	4,600	250
GreA/внутр. расщепление	6.6	2.9	1	37
5. GreB расщепление	0.6	10 ⁻³	0.2x10 ⁻³	0.2x10 ⁻³
<i>ДТ мутант</i>		600	3,000	3,000
GreB/внутр. расщепление	4.3	1.4	1	2

Данные приведены в k_{obs} (мин⁻¹). Скорости элонгации РНК были измерены при 21 °C, а скорости расщепления РНК при 37 °C. *Измерено при 1μM CTP. **Предел измерения в этом методе определяется фактом, что инкубация дольше 30 мин приводит к появлению продуктов неэнзиматической дегарации РНК.

Принципиальное наблюдение второй части настоящей работы состоит в том, что каждая из трех замен Asp/Asn в металл-связывающем центре РНКП вызывает сильное уменьшение *всех* видов каталитической активности РНКП (суммировано в Табл.2). Для каждой мутантной РНКП падение каталитической активности было сравнимым с наблюдаемым в односубъединичных полимеразах (таких как ДНК полимераз (ДНКП) I, ДНКП β, HIV обратная транскриптаза и др.), несущих замены в каталитических аминокислотных остатках. Из этого мы делаем вывод, что в многосубъединичных РНКП, каждый член Asp триады напрямую участвует в каталитическом акте. Каждая из замен вызвала значительное ослабление связывания Me^{2+} в свободной РНКП, как это свидетельствовало из неспособности мутантов поддерживать Fe^{2+} - опосредованное белковое расщепление и из неспособности повышенных концентраций Fe^{2+} компенсировать дефект. Результаты находятся в согласии с моделью, в которой в свободном ферменте каждый из трех аспаргатов напрямую координируется с Mg^{2+} I (Рис. 9 Б). На основании интенсивности окраски Кумасси, использованной для выявления продуктов расщепления, вызванных Fe^{2+} , мы установили, что в свободной РНКП индивидуальные замены уменьшают сродство к Fe^{2+} по крайней мере в 20 раз. Это находится в хорошем согласии с ~30-кратным эффектом, ожидаемым от потери одной координационной связи, как следует из сравнений констант диссоциации Mg^{2+} и

ионов цитрата (Cit^{3-}) и оксалата (Ox^{2-}) (10^{-4} М и 3×10^{-3} М соответственно (Лурье, 1989)) Интересно, что эти значения близки к ранее определенным константам диссоциации для свободной ДТ РНКП (Mustaev et al., 1997). В тройном элонгационном комплексе кажущаяся потеря сродства к Mg^{2+} , вызванная Asp-Asp заменой, была менее чем 10-кратной. Это может указывать на то, что взаимодействия, осуществляемые Mg^{2+} в свободной РНКП и в ТЭК, не эквивалентны. Очевидно, что фосфаты входящих НТР и/или 3'- гидроксильные остатки РНК вносят свой вклад в связывание Mg^{2+} в ТЭК и компенсируют дефект, наблюдаемый в свободной РНКП (Рис. 9 Б). В дополнение к этому, общее уменьшение свободной энергии при образовании элонгационного комплекса может также иметь стабилизирующий эффект.

Ясно, что наблюдаемые уменьшения сродства к ионам Mg^{2+} у мутантных ферментов количественно не могут отвечать за наблюдаемое сильное падение каталитической активности (Табл.2). Действительно, увеличение концентрации Mg^{2+} не восстанавливает каталитические функции мутантов. Другими словами, даже в условиях насыщения мутантного фермента Mg^{2+} его активный центр функционирует неправильно. Каждая из замен вызывает лишь небольшие изменения в кажущийся K_m для входящего СТР, которые не могут быть ответственными за наблюдаемые падения каталитической активности. Эти наблюдения показывают, что изученные замены должны влиять на химию образования фосфодиэфирной связи, наиболее вероятно через изменение ориентации каталитических ионов Mg^{2+} в активном центре.

ВЫВОДЫ

1. Впервые детально изучен механизм ингибирования РНК-полимеразы стрептолидигином. Доказано, что стрептолидигин ингибирует РНК-полимеразу по необычному механизму, при котором антибиотик, связываясь с элонгационным комплексом, приводит не к полной инактивации, а к сильному замедлению активности РНК-полимеразы.
2. Показано, что стрептолидигин ингибирует стадию рабочего цикла РНК-полимеразы, предшествующую образованию фосфодиэфирной связи в активном центре, при этом не влияя на связывание субстрата. Эта стадия видимо представляет собой опосредованный изгибанием F-спирали перенос находящегося в активном центре нуклеотида в оптимальное положение для катализа.
3. На основании структурных и биохимических данных по ингибированию РНК-полимеразы стрептолидигином была предложена новая модель функционирования активного центра РНК-полимеразы, в которой нуклеотид образует связь с комплементарным основанием ДНК в так называемом "прединсерционном" сайте, а затем переносится в "инсерционный" сайт, где происходит синтез фосфодиэфирной связи.
4. Подтвержден универсальный механизм синтеза и расщепления фосфодиэфирной связи в активном центре клеточной РНК-полимеразы с участием двух ионов двухвалентных металлов. Показано, что каждый из трех консервативных остатков аспарагиновой кислоты в активном центре фермента участвует в акте катализа.
5. Показано, что нуклеиновые кислоты вносят ощутимый вклад в связывание иона металла в активном центре элонгационного комплекса РНК-полимеразы, компенсируя отсутствие любого из трех участвующих в образовании координационных связей остатков аспарагиновой кислоты.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

1. V.Sosunov, S.Zorov, E.Sosunova, A.Nikolaev, I.Zakeeva, I.Bass, A.Goldfarb, V.Nikiforov, K.Severinov, A.Mustaev. The Role of the Aspartate Triad in Catalytic Activities of Multisubunit RNA Polymerase. 12th Biannual Meeting on Post-Initiation Activities of RNA Polymerases. Mountain Lake, VA. November, 4-7, 2004. Proceedings. p.4.
2. S.D.Zorov, N.S. Zenkin, K.V. Severinov, V.G.Nikoforov. The study of streptolydigin effects on the bacterial RNA-polymerase activities Russian Bioenergetics. From Molecules to cells. Moscow. February, 21-23, 2005, p.69.
3. С.Д.Зоров, И.Р.Закеева, Е.В.Сосунова, В.В.Сосунов. Изучение двуметаллического механизма катализа многосубъединичной РНК-полимеразы // Депон. в ВИНТИ 19.04.2005, 6, №534-B2005.
4. С.Д.Зоров, Н.С.Зенкин. Изучение механизма ингибирования бактериальной РНК-полимеразы антибиотиком стрептолидином.// Депон. в ВИНТИ 19.04.2005, 6, №535-B2005.

2/1

№ - 9627.

РНБ Русский фонд

2006-4
25587

Подписано в печать 12 мая 2005 г.

Заказ 460. Формат 60 x 90/16.

Тираж 100 экз.

**Отпечатано в салоне оперативной печати ПКФ.
Москва, Садовая-Черногрозская, 3Б. Тел. 778-97-47**