

1. *Bauer W. R.* Structure and reactions of closed duplex DNA // *Annu. Rev. Biophys. and Bioeng.*—1978.—7.—P. 287—313.
2. *Филиппович И. В., Сорокина Н. И.* Суперспиральная ДНК клеточного ядра // *Успехи соврем. биологии.*—1983.—95, № 2.—С. 163—180.
3. *Fisher M. L.* DNA supercoiling and gene expression // *Nature.*—1984.—307, N 5953.—P. 686—687.
4. *Грагеров А. И., Миркин С. М.* Влияние сверхспирализации ДНК на основные генетические процессы у прокариот // *Молекуляр. биология.*—1980.—14, № 1.—С. 8—34.
5. *Груздев А. Д., Белая А. Н.* Влияние концентрации водородных ионов, тоничности и ионной силы на размеры полигенных хромосом // *Цитология.*—1968.—10, № 3.—С. 297—305.
6. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—477 с.
7. *Gruzdev A. D., Kishchenko G. P.* Fluorescence polarization of study of stretched polytene chromosomes stained with acridine orange // *Biophys. Struct. and Mech.*—1978.—4, N 2.—P. 97—110.
8. *Hsieh T.-S., Wang J. C.* Thermodynamic properties of superhelical DNAs // *Biochemistry.*—1975.—14, N 3.—P. 527—535.
9. *Bauer W., Vinograd J.* Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. 2. The energy of superhelix formation in SV40 DNA // *J. Mol. Biol.*—1970.—47, N 4.—P. 419—435.
10. *Scatchard G.* The attractions of proteins for small molecules and ions // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1949.—51.—P. 660—672.
11. *Structure* of the nucleosome core particle of chromatin / *J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes et al.* // *Nature.*—1977.—269, N 5623.—P. 29—36.
12. *Periodicity* of deoxyribonuclease I digestion of chromatin / *A. Prunell, R. D. Kornberg, L. C. Lutter et al.* // *Science.*—1979.—204, N 4395.—P. 855—858.
13. *Nordheim A., Rich A.* Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segment within transcriptional enhancer sequences // *Nature.*—1983.—303, N 5919.—P. 674—679.
14. *Lyamichev U. I., Panyutin I. G., Frank-Kamenetskii M. D.* Evidence of cruciform structures in superhelical DNA provided by two-dimensional gel electrophoresis // *FEBS Lett.*—1983—153, N 2.—P. 298—302
15. *Frank-Kamenetskii M. D., Vologodskii A. V.* Thermodynamics of the B-Z transition in superhelical DNA // *Nature.*—1984.—307, N 5950.—P. 481—482.
16. *Nicol J. M., Felsenfeld G.* DNA conformation at the 5' end of the chicken adult β -globin gene // *Cell.*—1982—35, N 2.—P. 467—477.
17. *Gorovskiy M. A., Woodward J.* Histone content of chromosomal loci active and inactive in RNA synthesis // *J. Cell. Biol.*—1967.—33, N 3.—P. 723—728.

Ин-т цитологии и генетики
Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск

Получено 08.08.86

УДК 577.217.5:577.18.02

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МАТРИЧНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИ(U) И ПОЛИ(dT) В БЕСКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* И ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ

А. П. Потапов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткина, А. В. Ельская

Введение. Для объяснения молекулярного механизма кодонзависимого отбора аминоксил-тРНК на рибосоме и транслокации была предложена гипотеза о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов при трансляции [1, 2]. Центральным положением гипотезы является допущение о прямом взаимодействии некоторого участка рибосомы X с кодон-антикодоновым дуплексом. Предполагается, что формирование тройного комплекса X·(кодон—антикодон) — необходимое условие точной селекции аминоксил-тРНК в А-центре рибосомы и затем правильной транслокации этой тРНК (в форме пептидил-тРНК) из А- в Р-центр. Специфичность сборки тройного комплекса определяется постулируемой гипотезой стереоспецифичностью X к комплементарным кодон-антикодоновым парам, олознаваемым по пространственной структуре их сахаро-фосфатных остовов [1, 2].

Очевидно, что при таком механизме работы рибосомы изменения структуры X-участка, равно как и модификации структуры сахаро-фосфатных остовов кодона и антикодона, должны существенно влиять на эффективность процесса трансляции. В этой связи большой интерес представляет известный с 60-х годов феномен неспособности бактериальных систем белкового синтеза к прямой трансляции однопятовой ДНК в обычных условиях и приобретения этой способности в присутствии аминогликозидного антибиотика неомидина, действие которого предположительно направлено именно на рибосому [3—5]. Механизм этого явления практически не изучен.

Задача данной работы состояла в сравнительном изучении матричной активности поли(U) и ее дезоксирибоаналога, поли(dT), в бесклеточных белоксинтезирующих системах про- (*E. coli*) и эукариотического (зародыши пшеницы) происхождения в отсутствие и присутствии неомидина и изучении механизма действия этого антибиотика.

Материалы и методы. В экспериментах использовали поли(U) и трис фирмы «Reanal» (ВНР); 2-меркаптоэтанол — «Merck» (ФРГ); GTP, АТР, креатинфосфат, креатинфосфокиназа (КФ 2.7.3.2), пурамицил — «Calbiochem» (США); [¹⁴C]-фенилаланин (13 ГБк/ммоль), [¹⁴C]-лейцин (9 ГБк/ммоль) — СССР; поли(dT), суммарный препарат тРНК из дрожжей производства НИКТИ БАВ (Бердск, СССР); суммарный препарат тРНК из *E. coli*, паста *E. coli* MRE 600 — «Биолар» (Олайне, СССР); РРО, РОРОР, толуол, кислоты, щелочи и соли — осч отечественного производства.

Получение фракции S-30 из зародышей пшеницы. В работу брали пшеницу сорта «Мионовская 808», зародыши которой выделяли по методу Маркуса [6]. Фракцию S-30 гомогената зародышей пшеницы получали по методу Робертса и Паттерсона [7].

Получение фракции S-30 из клеток *E. coli*. 1 г бактериальной пасты растирали с 1 г Al₂O₃ с последующим добавлением 5 мл буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 100 мМ KCl, 1 мМ Mg(CH₃COO)₂, 2 мМ CaCl₂, 6 мМ 2-меркаптоэтанол (или 1 мМ дитиотреитол). После центрифугирования гомогената при 30000 g в течение 45 мин супернатант отбирали. Концентрацию ионов магния в растворе доводили до 3,5 мМ, добавляли АТР до 1 мМ, GTP до 20 мкМ, ДТТ до 2 мМ, креатинфосфат до 8 мМ, креатинфосфокиназу до концентрации 40 мкг/мл и преинкубировали в течение 5 мин при 30°C, добавляли пурамицил до конечной концентрации 0,5 мМ и еще инкубировали 10 мин. После преинкубации супернатант наносили на колонку с сефадексом G-25, уравновешенную буфером, содержащим 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 120 мМ KCl, 5 мМ Mg(CH₃COO)₂, 6 мМ 2-меркаптоэтанол. Материал, выходящий в свободном объеме колонки, собирали, фасовали и хранили в жидком азоте.

Трансляция синтетических полинуклеотидов. Пробы объемом 50 мкл содержали 30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 75 мМ KCl, переменные концентрации ионов магния (см. подписи к рис.), 2 мМ дитиотреитол, 2 мМ АТР, 0,1 мМ GTP, 12 мМ креатинфосфат, 1,5 мкг креатинфосфокиназы, 60 мкМ [¹⁴C]-фенилаланин (в экспериментах по изучению точности трансляции поли(U) и поли(dT) вносили 60 мкМ [¹⁴C]-фенилаланин и 60 мкМ [¹²C]-лейцин при определении уровня включения фенилаланина и 60 мкМ [¹⁴C]-лейцин и 60 мкМ [¹²C]-фенилаланин в случае определения уровня ошибочного включения лейцина), 25 мкг поли(U) или 3 мкг поли(dT), 1 ед. A₂₆₀ S-30 из *E. coli* или зародышей пшеницы, 25 мкг суммарного препарата тРНК из *E. coli* или дрожжей соответственно. Пробы инкубировали при 37°C в течение 90 мин. Количество синтезированного полифенилаланина определяли по радиоактивности ТХУ-нерастворимого осадка [8], измеренной на счетчике SL-40 («Intertechnique», Франция) в системе толуол — РРО — РОРОР с эффективностью 80 %.

Безматричный синтез дифенилаланина проводили в условиях, идентичных описанным для трансляции поли(U) и поли(dT), но без полинуклеотидной матрицы в бесклеточной системе из *E. coli* при 12 мМ Mg(CH₃COO)₂. Мономерный фенилаланин и дифенилаланин разделяли нисходящей хроматографией на бумаге FN-15 в системе n-бутанол : уксусная кислота : вода = 78 : 5 : 17 [9]. Хроматограмму сушили и разрезали на полосы длиной 1 см. Количество дифенилаланина оценивали по радиоактивности соответствующего пика.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования матричной активности поли(U) и поли(dT) в бесклеточных системах белкового синтеза из зародышей пшеницы и *E. coli* представлены на рис. 1. Соответствующее изучение синтеза полифенилаланина проводилось в широких пределах концентрации ионов магния и при различных концентрациях неомицина (0, 50, 100, 200 мкМ). Имеет место сложная картина воздействия антибиотика на эффективность трансляции, зависящая от природы (источника) бесклеточной системы, концентрации ионов магния и неомицина.

Так, в системе из зародышей пшеницы трансляция поли(U) при субоптимальных концентрациях Mg^{2+} (<10 мМ) может стимулироваться 50 мкМ неомицином (рис. 1, а). Тогда как та же концентрация антибиотика при концентрациях Mg^{2+} больших 10 мМ оказывает отчетливое ингибирующее действие. Характерно, что с увеличением содержания неомицина наблюдается некоторое понижение и

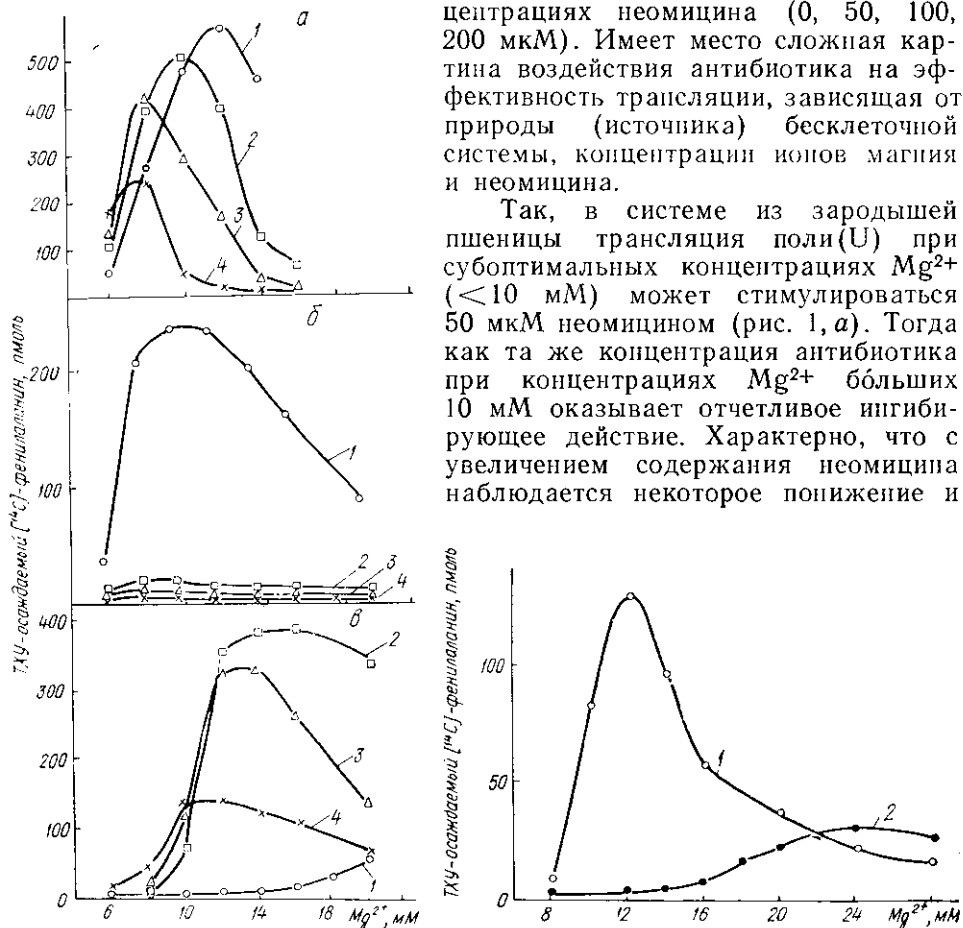


Рис. 1. Зависимость уровня включения [¹⁴С]-фенилаланина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции от концентрации ионов магния и неомицина: а, б — трансляция поли(U) в бесклеточных системах из зародышей пшеницы и *E. coli* соответственно; в — трансляция поли(dT) в бесклеточной системе из *E. coli*. Концентрация неомицина: 1—0; 2—50; 3—100; 4—200 мкМ

Fig. 1. The effect of Mg^{2+} and neomycin concentration on the incorporation of [¹⁴C]-phenylalanine into the TCA-insoluble product: а, б — poly(U)-directed synthesis of polyphenylalanine in the cell-free system from wheat germ and *E. coli*, respectively; в — poly(dT)-directed synthesis in the cell-free system from *E. coli*. Concentration of neomycin: 1—0; 2—50; 3—100; 4—200 μM

Рис. 2. Уровень включения [¹⁴С]-фенилаланина в продукт трансляции поли(U) (1) и поли(dT) (2) в зависимости от концентрации ионов магния в бесклеточной системе из *E. coli*

Fig. 2. The effect of Mg^{2+} and neomycin concentration on the incorporation of [¹⁴C]-phenylalanine into poly(U)- (1) or poly(dT)-directed (2) TCA-insoluble product in the cell-free system from *E. coli*

отчетливое смещение максимума кривых в сторону малых концентраций ионов магния (рис. 1, а). Иными словами, неомицин ведет себя как синергист Mg^{2+} , что согласуется с наличием шести аминогрупп в молекуле антибиотика.

Трансляция поли(dT) в системе из зародышей пшеницы не была обнаружена. Внесение в систему неомицина не меняло ситуации.

Прокариотическая система трансляции из *E. coli* существенно более чувствительна к антибиотику. Так, уже 50 мкМ неомицина почти

полностью подавляет считывание поли(U) (рис. 1, б) и заметно стимулирует трансляцию поли(dT) (рис. 1, в). Дальнейшее увеличение концентрации антибиотика усиливает ингибирование трансляции поли(U) и начинает угнетать трансляцию поли(dT).

Заслуживает особого внимания то обстоятельство, что области концентраций Mg^{2+} , оптимальные для трансляции поли(U) и поли(dT), существенно различаются. Эффективная трансляция поли(dT) возможна лишь при относительно высоких концентрациях Mg^{2+} , при которых трансляция поли(U) сильно подавлена (рис. 1). Интересно, что трансляция поли(dT) может быть индуцирована и в отсутствие неомицина аномально высокой концентрацией ионов магния (16—28 мМ) (рис. 2). Однако, как показали специальные опыты, для обеспечения высокого уровня поли(dT)-зависимого синтеза полифенилаланина требуется сочетание высокой концентрации Mg^{2+} и относительно небольших, порядка 10^{-6} М, концентраций неомицина.

Уровень включения [^{14}C]-фенилаланина и [^{14}C]-лейцина в продукт трансляции поли(U) и поли(dT) в отсутствие и присутствии 10 мкМ неомицина
The level of poly(U)- or poly(dT)-directed incorporation of [^{14}C]-phenylalanine and [^{14}C]-leucine into TCA-insoluble product in the absence or presence of 10 μ M neomycin

Вид матрицы	Неомицин	12 мМ Mg^{2+}			20 мМ Mg^{2+}		
		Фен, пмоль	Лей, пмоль	Фен/Лей	Фен, пмоль	Лей, пмоль	Фен/Лей
Поли(U)	—	93,8	8,2	11,4	23,8	7,3	3,3
	+	2,9	1,9	1,5	0,4	0,5	0,8
Поли(dT)	—	3,3	—	—	11,6	—	—
	+	160,7	1,7	94,5	26,3	1,9	13,8

Из сопоставления данных, полученных с использованием про- и эукариотических систем трансляции, следует, что обе системы чрезвычайно чувствительны к структуре сахаров считываемых кодонов. В действии неомицина может быть выделена специфическая составляющая, характерная лишь для системы из *E. coli*, и неспецифическая, характерная для обеих систем и проявляющаяся при относительно высоких концентрациях антибиотика.

В зависимости от конкретных условий трансляции матричные активности поли(U) и поли(dT) изменяются взаимосвязанным и противоположным образом.

При сравнении точности декодирования поли(U) и поли(dT) по уровням включения лейцина и фенилаланина в ТХУ-нерастворимый продукт трансляции оказалось, что как в присутствии, так и в отсутствие неомицина точность считывания поли(dT) гораздо выше, чем поли(U) (таблица). Как и следовало ожидать, неомицин понижал точность считывания поли(U). В случае же поли(dT) количественная оценка влияния антибиотика на точность затруднена из-за очень низкого уровня включения лейцина в отсутствие неомицина. В работах [3, 10] отмечался факт довольно высокой точности прочтения полидезоксирибонуклеотидов и, в частности, поли(dT). Здесь мы хотели бы особо подчеркнуть, что точность считывания поли(dT) в присутствии антибиотика не просто высока, она даже выше, чем в случае поли(U) во всех исследуемых нами условиях (12 и 20 мМ Mg^{2+} , в присутствии и в отсутствие неомицина) (таблица). Следовательно, трансляция поли(dT) сохраняет все черты матричнозависимого процесса, характерного для трансляции поли(U). Антибиотик не «ломает» рибосомный механизм декодирования, а лишь изменяет его матричную специфичность.

Для выяснения механизмов, определяющих компетентность систем в считывании рибо- или дезоксирибополинуклеотидных матриц, и вы-

явления «узких мест» их трансляции начато изучение влияния неомицина на отдельные стадии этого процесса.

Предварительная инкубация полностью собранной системы из *E. coli* в течение 5 мин с последующим добавлением неомицина позволяет оценить действие антибиотика на собственно элонгацию трансляции поли(U). Как следует из рис. 3, неомицин сильно ингибирует элонгацию поли(U)-зависимого синтеза полифенилаланина.

Анализ кинетики безматричного синтеза дифенилаланина (рис. 4) свидетельствует о практически полном отсутствии влияния неомицина

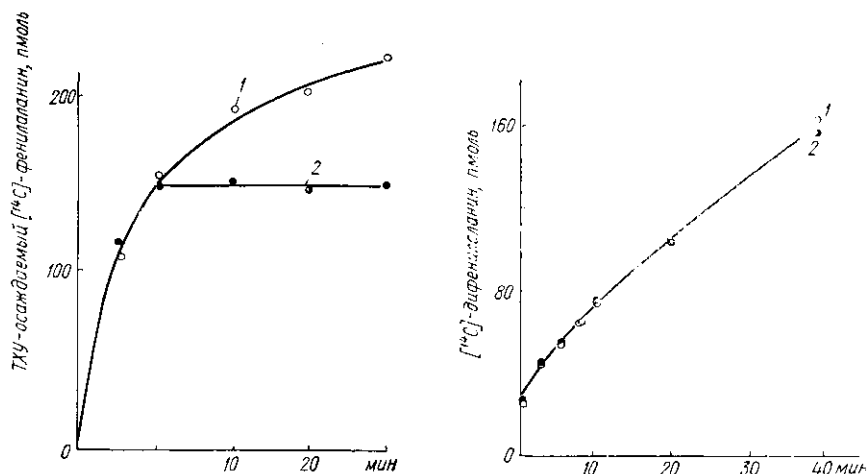


Рис. 3. Кинетика включения [¹⁴C]-фенилаланина в продукт трансляции поли(U) в отсутствие (1) и присутствии (2) 10 мкМ неомицина. Антибиотик вносили после 5 мин инкубации

Fig. 3. The kinetics of poly(U)-directed incorporation of [¹⁴C]-phenylalanine into TCA-insoluble product with (2) or without (1) 10 μM neomycin

Рис. 4. Кинетика безматричного синтеза дифенилаланина в системе трансляции из *E. coli* в отсутствие (1) и присутствии (2) 10 мкМ неомицина

Fig. 4. The effect of neomycin on the kinetics of template-free diphenylalanine formation in the cell-free system from *E. coli* with (2) or without (1) 10 μM neomycin

на стадию транспептидации. Это заключение противоречит выводам Пестки [11], который на основании подавления неомицином реакции образования пептидил-пурамицина делает заключение о влиянии этого антибиотика на этап транспептидации. На наш взгляд, эти результаты [11] правильнее объяснить эффективной конкуренцией неомицина с пурамицином за связывание с пептидилтрансферазным центром.

Таким образом, механизм изменения компетенции систем трансляции под влиянием неомицина связан не с этапом транспептидации, а с матричнозависимыми процессами связывания аминоксил-тРНК на рибосоме и (или) транслокации. В соответствии с постулируемой стереоспецифичностью декодирующего центра рибосомы к сахарофосфатным остовам кодон-антикодонного дуплекса [1, 2] эти результаты свидетельствуют о том, что системы трансляции чрезвычайно чувствительны к структуре сахаров кодонов. Способность систем к трансляции полинуклеотидов (по крайней мере, поли(U) и поли(dT)) может изменяться лишь по принципу «либо рибо-, либо дезоксирибополинуклеотидная матрица». Последнее предположительно может быть объяснено необходимостью изменения стереоспецифичности узнающего участка декодирующего центра рибосомы.

Авторы благодарят И. В. Бартиша за помощь на начальных этапах работы и А. П. Сургучева за предоставленный препарат неомицина.

COMPARATIVE STUDY OF POLY(U) AND POLY(dT) TEMPLATE ACTIVITY
IN CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIZING SYSTEMS
FROM ESCHERICHIA COLI AND WHEAT GERM

A. P. Potapov, K. A. Soldatkin, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

To study the role of the codon sugar-phosphate backbone in mRNA decoding process we have compared the messenger activity of authentic ribo- and deoxyribopolynucleotides, poly(U) and poly(dT), in bacterial (*E. coli*) and plant (wheat germ) cell-free protein-synthesizing systems with and without neomycin (aminoglycoside antibiotic).

The effect of neomycin significantly depends on the nature of the cell-free system, magnesium ion and antibiotic concentration. The *E. coli* system is very sensitive to neomycin. In the presence of neomycin the translation of poly(U) is deeply suppressed, while the translation of poly(dT) is greatly stimulated. The eukaryotic system is relatively insensitive to low concentrations of the antibiotic and unable to translate poly(dT).

The results obtained indicate that the translation systems are very sensitive to the structure of the messenger sugars and that the system capacity to translate polynucleotide can be transformed only according to the principle «either ribo- or deoxyribopolynucleotide messenger».

The transforming agent neomycin does not affect the stage of transpeptidation.

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // FEBS Lett.—1982.—146, N 1.—P. 5—8.
2. Потанов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.—1985.—46, № 1.—С. 63—77.
3. Morgan A. R., Wells R. D., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. 74. Direct translation *in vitro* of single-stranded DNA-like polymers with repeating nucleotide sequences in the presence of neomycin B // J. Mol. Biol.—1967.—26, N 3.—P. 477—497.
4. McCarthy B. J., Holland J. J. Denaturated DNA as a direct template for *in vitro* protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1965.—54, N 3.—P. 880—886.
5. Bretscher M. S. Direct translation of bacteriophage *φ*d DNA in the absence of neomycin B // J. Mol. Biol.—1969.—42, N 4.—P. 595—598.
6. Marcus A., Efron D., Weeks D. P. The wheat embryo cell-free system // Meth. Enzymol.—1974.—30, pt F.—P. 749—754.
7. Roberts B. E., Patterson B. M. Translation of eukaryotic mRNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1970.—70, N 8.—P. 2330—2339.
8. Неоднозначность трансляции полиуридилевой кислоты транспортными РНК из различных эукариотических объектов / А. П. Солдаткин, Н. И. Желтовская, Г. В. Овчаренко, А. В. Ельская // Укр. биохим. журн.—1983.—55, № 6.—С. 603—607.
9. Hamburger A. D., De Groot N., Lapidot Y. Peptidyl-tRNA. 11. The chemical synthesis of phenylalanine-containing oligopeptidyl-tRNA // Biochim. et biophys. acta.—1970.—213, N 1.—P. 115—123.
10. Salas J., Bollum F. G. Biosynthetic polydeoxynucleotides as direct templates for polypeptide synthesis // J. Biol. Chem.—1968.—243, N 5.—P. 1012—1015.
11. Pestka S. Inhibitors of protein synthesis // Molecular mechanisms of protein biosynthesis / Eds H. Weissbach, S. Pestka.—New York et al.: Acad. press, 1977.—P. 467—553.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР,
Киев

Получено 16.07.86