



УДК 577.217.5:577.18.02

И. С. Гройсман, А. П. Потапов

## ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ БЕЛКА S12 РИБОСОМ ESCHERICHIA COLI НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСЛЯЦИИ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДНОЙ МАТРИЦЫ ПОЛИ(dT)

*С использованием бесклеточных белоксинтезирующих систем из изогенных штаммов E. coli, различающихся мутациями в рибосомном белке S12, продемонстрировано наличие положительной корреляции между ошибаемостью рибосом при трансляции поли(U) и эффективностью трансляции «ошибочной» матрицы — поли(dT). Эффективность поли(dT)-зависимого синтеза полифенилаланина рибосомами с мутациями в белке S12, характеризующимися пониженной частотой ошибок декодирования поли(U), ниже, чем исходными рибосомами. Полученные данные подтверждают предположение об отборе рибосомой кодон-антикодонной пары как единого целого, которое следует из гипотезы о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов декодирующим центром рибосом.*

**Введение.** Для объяснения молекулярного механизма кодонзависимого отбора аминоксил-тРНК и транслокации предложена гипотеза о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов [1, 2]. Центральным положением гипотезы является допущение о прямом взаимодействии декодирующего центра рибосомы с сахарофосфатным остовом комплементарных кодон-антикодонных дуплексов. Очевидно, что при таком механизме работы рибосомы изменение структуры сахарофосфатных остовов кодона и антикодона должно существенно влиять на эффективность процесса трансляции. Природным вариантом модифицированной таким образом матрицы является ДНК. В обычных условиях односторонняя ДНК не транслируется 70S рибосомами *E. coli* [3, 4]. Антибиотик неомицин способен разблокировать трансляцию односторонней ДНК, причем параллельно он ингибирует трансляцию РНК [3—5]. Способность бактериальных систем к трансляции поли(U) и поли(dT) может быть изменена в соответствии с принципом «либо рибо-, либо дезоксирибонуклеиновая матрица» [5, 6]. Исходя из предположения о взаимодействии декодирующего центра рибосомы с сахарофосфатным остовом кодон-антикодонной пары следует ожидать, что условия, влияющие на количество ошибок при трансляции поли(U) (ошибки «отбора антикодона»), должны сходным образом влиять на эффективность трансляции поли(dT) (ошибки «отбора кодона»). Одним из факторов, контролирующих однозначность декодирования матриц, является структура рибосомных белков. Мутационные изменения белка S12 малой субчастицы 70S рибосом, определяющие стрептомицин-устойчивый фенотип *E. coli*, приводят к повышению точности трансляции [7]. Задача данной работы состояла в поиске возможной корреляции между влиянием мутаций по белку S12 на ошибочное включение [<sup>14</sup>C]лейцина в продукт трансляции поли(U) и эффективность трансляции поли(dT).

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали поли(U) и трис фирмы «Reanal» (ВНР); 2-меркаптоэтанол — «Merck» (ФРГ); GTP, ATP, креатинфосфат, креатинфосфокиназа (КФ 2.7.3.2), пурамицин, неомицин — «Calbiochem» (США); [<sup>14</sup>C]фенилаланин (13 ГБк/ммоль), [<sup>14</sup>C]лейцин (9 ГБк/ммоль) — ЧССР; поли(dT) — НИКИ БАН (Бердск, СССР); суммарный препарат тРНК из *E. coli* — НПО «Биолар» (Олайне, СССР); стрептомицин — завод медпрепаратов (Киев, СССР); аминокептид — завод медпрепаратов (Ленинград, СССР); РРО, РОРОР, толуол, кислоты, щелочи, соли, агар — «осч» отечественного производства. Изогенные штаммы *E. coli*: исходный штамм хАс, а также мутанты *uL433*, *uL477*, *uL435* с мутациями по белку S12 (*rpsL224*,

*rpsL282*, *rpsL1204* соответственно) были любезно предоставлены Л. Исакссоном (Швеция). Биомассу *E. coli* нарабатывали согласно Миллеру [8], в качестве среды для выращивания культуры использовали аминокислоты. Фракцию S-30 *E. coli* получали по стандартной методике [5]. Материал хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Трансляция синтетических полинуклеотидов. Пробы объемом 50 мкл содержали 30 мМ трис-НСl, рН 7,5, 75 мМ КCl, переменные концентрации ионов магния, 2 мМ дитиотреитол, 2 мМ АТР, 0,1 мМ GTP, 12 мМ креатинфосфат, 1,5 мкг креатинфосфокиназы, 60 мкМ [ $^{14}\text{C}$ ]фенилаланин (в экспериментах по изуче-

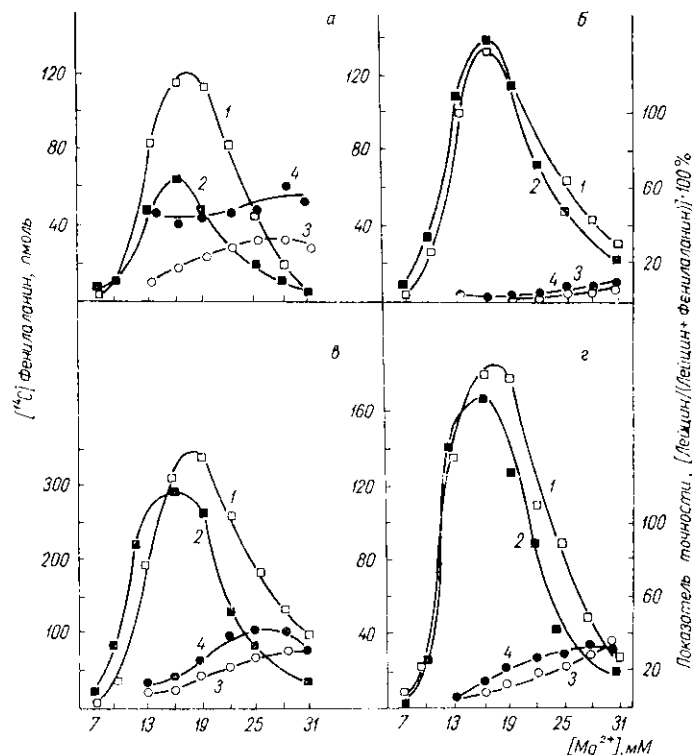


Рис. 1. Зависимость включения [ $^{14}\text{C}$ ]фенилаланина (1, 2) в ТХУ-осаждаемый продукт трансляции поли(U) и показателя точности трансляции поли(U) (3, 4) от концентрации ионов магния: а — в бесклеточной системе трансляции из исходного штамма *xAc*; б, в, г — из штаммов с мутацией в белке S12: *uL433*, *uL477*, *uL435* соответственно; 1, 3 — в отсутствие антибиотика; 2, 4 — в присутствии 50 мкМ стрептомицина

Fig. 1. The effect of  $\text{Mg}^{2+}$  concentration on poly(U)-directed incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]phenylalanine (1, 2) into TCA-precipitated product and a fidelity index of poly(U)-translocation in the cell-free system from different strains of *E. coli*: а — *xAc*, б — *uL433*, в — *uL477*; г — *uL435*; 1, 3 — without streptomycin; 2, 4 — in the presence of 50  $\mu\text{M}$  streptomycin

нию точности трансляции поли(U) в пробу вносили 60 мкМ [ $^{14}\text{C}$ ]фенилаланин и [ $^{12}\text{C}$ ]фенилаланин и 60 мкМ [ $^{14}\text{C}$ ]лейцин в случае определения ошибочного включения лейцина), 30 мкг поли(U) или 3 мкг поли(dT), 0,8—1,2 ед.  $\Lambda_{260}$  фракций S-30 из *E. coli*, 25 мкг суммарного препарата тРНК из *E. coli*. Пробы инкубировали в течение 90 мин. Количество синтезированного полифенилаланина определяли по радиоактивности ТХУ-нерастворимого осадка [9], измеренной на счетчике SL-40 («Intertechnique», Франция) в системе толуол — РРО — РОРОР с эффективностью 80 %.

**Результаты и обсуждение.** Результаты проверки чувствительности бесклеточных систем трансляции из различных штаммов *E. coli* к стрептомицину приведены на рис. 1. Антибиотик заметным образом понижал эффективность и точность трансляции поли(U) в бесклеточной системе из исходного штамма *xAc* (рис. 1, а). Бесклеточные же системы из штаммов с мутациями *rpsL224*, *rpsL282*, *rpsL1204* проявляли повышенную, хотя и различную, устойчивость к стрептомицину (рис. 1, б—г). Ошибочное включение [ $^{14}\text{C}$ ]лейцина в продукт трансляции поли(U) в бесклеточных системах из мутантных штаммов было ниже, чем в бесклеточной системе из штамма *xAc* (рис. 1, а—г).

Эта закономерность сохранялась в области концентрации ионов магния, оптимальной для синтеза полифенилаланина. Наибольшей устойчивостью к стрептомицину и точностью трансляции поли(U) обладал штамм с мутацией *rpsL224* (рис. 1, б).

Оценку эффективности трансляции поли(dT) в бесклеточных системах из указанных штаммов проводили в тех же условиях, что и трансляцию поли(U), но в присутствии 50 мкМ неомицина (рис. 2). С учетом разной активности систем при трансляции поли(U) (рис. 1) сравнение эффективности трансляции в них поли(dT) проводили, сопоставляя эффективность декодирования дезоксирибо- и рибонуклеотидной матриц.

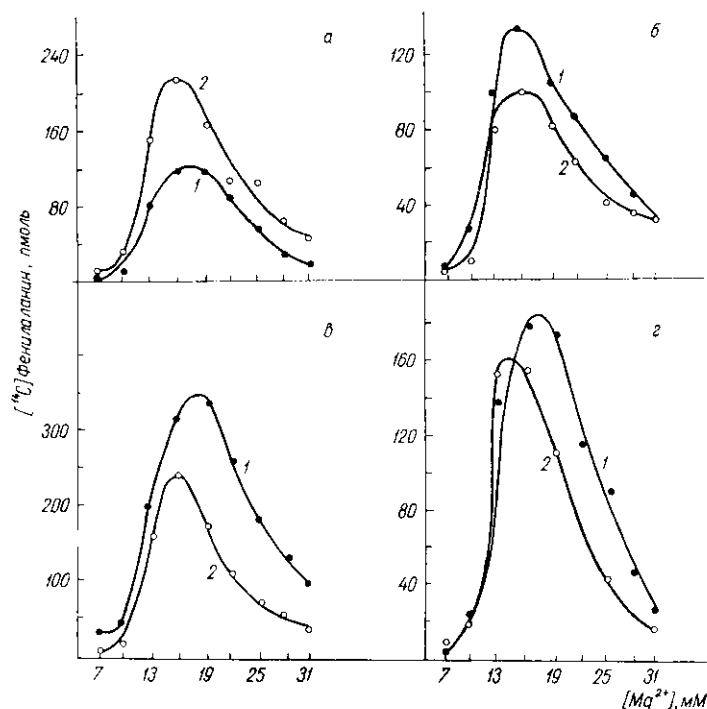


Рис. 2. Уровень включения  $[^{14}\text{C}]$ фенилаланина в продукт трансляции поли(U) (1) и поли(dT) (2) в зависимости от концентрации ионов магния: а — в бесклеточной системе трансляции из исходного штамма *xAc*; б, в, г — в бесклеточных системах трансляции из штаммов с мутацией в белке *S12*: *uL433*, *uL477*, *uL435* соответственно; 1 — в отсутствие антибиотика; 2 — в присутствии 50 мкМ неомицина

Fig. 2. The effect of  $\text{Mg}^{2+}$  concentration on poly(U)-(1) or poly(dT)-directed (2) incorporation of  $[^{14}\text{C}]$ phenylalanine into TCA-insoluble product in the cell-free system from different strains of *E. coli*: а — *xAc*; б — *uL433*; в — *uL477*; г — *uL435*, 2 — in the presence of 50  $\mu\text{M}$  neomycin

Для всех мутантных штаммов эффективность трансляции поли(dT) не превышала таковой поли(U) (рис. 2, б — г). Для исходного же штамма *xAc* наблюдалось обратное соотношение — эффективность трансляции поли(dT) примерно в 2 раза превосходила эффективность трансляции поли(U) (рис. 2, а). Указанное соотношение эффективности трансляции поли(U) и поли(dT) устойчиво воспроизводилось в широком диапазоне концентрации ионов магния.

Приведенные данные указывают на наличие положительной корреляции между ошибаемостью рибосом при поли(U)-зависимом выборе аминоксил-тРНК и эффективностью трансляции «ошибочной» матрицы поли(dT). Эффективность трансляции поли(dT) рибосомами с мутациями в белке *S12* ниже, чем исходными рибосомами. Мутации, уменьшающие количество ошибок при выборе антикодона, также уменьшают способность рибосом к считыванию «ошибочного» кодона комплементарным антикодоном. Это наблюдение подтверждает исходное предположение об отборе рибосомой кодон-антикодоновой пары как единого целого, и хорошо согласуется с гипотезой о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов декодирующим центром рибосомы [1, 2].

Авторы благодарят доктора Л. Исакссона за любезное предоставление штаммов *E. coli* с мутациями в белке *S12*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl selection at the ribosome // FEBS Lett.—1982.—146, N 1.—P. 5—8.
2. Потатов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.—1985.—46, № 1.—С. 63—77.
3. 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.
4. Salas J., Bollum F. J. Biosynthetic polydeoxynucleotides as direct templates for polypeptide synthesis // J. Biol. Chem.—1986.—243, N 5.—P. 1012—1015.
5. Сравнительное изучение матричной активности поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *Escherichia coli* и зародышевой пшеницы / А. П. Потатов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 3.—С. 133—138.
6. The role of template sugar-phosphate backbone in the ribosomal decoding mechanism. Comparative study of poly(U) and poly(dT) template activity / A. P. Potapov, K. A. Soldatkin, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya // J. Mol. Biol.—1988.—203, N 3.—P. 885—893.
7. Davies J., Gilbert W., Gorini L. Streptomycin, suppression and the code // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1964.—51, N 5.—P. 883—890.
8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1984.—436 с.
9. Неоднозначность трансляции полирибидиновой 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.

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

Получено 06.02.89

### THE EFFECT OF *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMAL PROTEIN *S12* MUTATIONS ON THE EFFICIENCY OF DEOXYRIBONUCLEOTIDE MATRIX POLY(dT) TRANSLATION

I. S. Groisman, A. P. Potapov  
Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The efficiency of poly(dT) translation has been studied in cell-free systems from wild-type *E. coli* and streptomycin-resistant mutants with altered ribosome protein *S12*. The data show that there is a positive correlation between poly(U) misreading and efficiency of poly(dT) translation. Mutant ribosomes translate poly(U)-template more accurately than ribosomes from wild-type bacteria and they are less efficient in translation of poly(dT) as well. The ribosome seems to select codon-anticodon pair as a whole unit. The data are in good agreement with hypothesis of stereospecific stabilization of codon-anticodon complex by the ribosome.

УДК 577.21:581.143.6:633.511

Ш. А. Аршаджанов, Х. А. Хакимов, Ш. Х. Ходжаева

### БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ХЛОПЧАТНИКА В СТАДИИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА

В культуре ткани тетраплоидных видов хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. и *G. barbadense* L., и также их гибридной линии А-4118 исследована динамика активности синтеза ДНК, РНК и белков в процессе каллусогенеза с помощью <sup>3</sup>H-тимидина, <sup>3</sup>H-уридина и <sup>14</sup>C-лейцина. Обнаружены некоторые особенности включения меченых предшественников в клетки хлопчатника в различные фазы каллусогенеза.

**Введение.** Метаболизм клеток растений, в частности хлопчатника, в ходе дедифференцировки и последующего активного деления пока еще изучен недостаточно полно. Между тем знание молекулярных механиз-