

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evidence for the ability of L10 ribosomal proteins of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* to regulate *rplJL* gene expression in *Escherichia coli* // E. B. Paton, M. I. Woodmaska, I. V. Kroupskaya et al. // FEBS Let.—1990.—265, N 1, 2.— P. 129—132.
2. Живолуп А. Н., Кириченко И. В., Патон Е. Б. Рибосомный белок L10 *Escherichia coli* способен регулировать экспрессию генов *rplJL* *Salmonella typhimurium* // Биополимеры и клетка.—1982.—8, № 3.—С. 37—39.
3. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning—a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab.—1982.—545 p.
4. Merrick M. J., Gibbins J. R., Postgate J. R. A rapid and efficient method for plasmid transformation *K. pneumoniae* and *E. coli* // J. Gen. Microbiol.—1987.—133; N 8.— P. 2053—2057.
5. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 13.— P. 6127—6145.
6. Патон Е. Б., Крупская И. В., Живолуп А. Н. Определение минимального сегмента рибосомного белка L10 *E. coli*, сохраняющего регуляторную функцию // Докл. АН СССР.—1989.—309, № 2.—С. 493—496.
7. Sor F., Nomura M. Cloning and DNA sequence determination of the L11 ribosomal protein operon of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris*: Translation feedback regulation of the *Escherichia coli* L11 operon by heterologous L1 proteins // Mol. and Gen. Genet.—1987.—210, N 1.— P. 52—59.
8. Linn T., Pierre R. S. Improved vector system for construction transcriptional fusions that ensures independent translation of *lacZ* // J. Bacteriol.—1990.—172, N 2.— P. 1077—1084.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН Украины,  
Киев

Получено 04.11.91.

УДК 577.217.5:577.18.02

Н. И. Шульга, А. П. Потапов

### ВЛИЯНИЕ НЕОМИЦИНА НА ТРАНСЛЯЦИЮ ПОЛИ (U) И ПОЛИ (dT) В БЕСКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ ИЗ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* И *NEUROSPORA CRASSA*

Исследовано влияние различных концентраций ионов магния и аминокликовидного антибиотика неомицина на трансляцию поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *S. cerevisiae* и *N. crassa*. Показано, что трансляция поли(U) и поли(dT) осуществляется цитоплазматическими рибосомами. Повышенные концентрации ионов магния стимулируют трансляцию поли (dT), неомицин в отличие от прокариотических систем оказывает угнетающее действие на трансляцию обеих матриц. Высказано предположение об эволюции структуры декодирующего центра рибосомы в направлении возрастания избирательности по отношению к структуре сахара-фосфатного остова матрицы.

**Введение.** Гипотеза стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов была предложена для объяснения селекции аминоацил-тРНК на рибосоме [1, 2]. Она постулирует прямое взаимодействие декодирующего центра рибосомы с сахара-фосфатным остовом кодон-антикодоновых комплексов, благодаря чему рибосома «оценивает» стерические параметры последних. Предполагается, что изменение стереохимических параметров кодон-антикодоновых дуплексов или декодирующего центра способно оказывать существенное влияние на точность процесса трансляции.

Природным полимером с измененным сахара-фосфатным остовом является ДНК. Параллельное исследование трансляции поли(U) и поли(dT) в бесклеточных системах из прокариот показало, что повышенные концентрации ионов  $Mg^{2+}$  и антибиотик неомицин ингибируют

© Н. И. ШУЛЬГА, А. П. ПОТАПОВ, 1992

ют синтез полифенилаланина на матрице поли(U) и разблокируют трансляцию поли(dT) [3, 4]. Способность систем считывать полинуклеотид может изменяться по принципу «либо рибо-, либо дезоксирибоматрица». Эти данные свидетельствуют о высокой чувствительности прокариотических рибосом к структуре сахаро-фосфатного остова матрицы. Наряду с этим было показано, что рибосомы из высших эукариот обладают строгой избирательностью по отношению к структуре сахаро-фосфатного остова матрицы и не способны изменять ее под влиянием ионов магния и неомицина [5].

Целью настоящей работы было исследование специфичности декодирующего центра рибосом из *S. cerevisiae* и *N. crassa* к структуре сахаро-фосфатного остова синтетических матриц поли(U) и поли(dT), а также влияния различных концентраций неомицина на изменение этой специфичности.

**Материалы и методы.** Использовали штаммы из Всесоюзной коллекции микроорганизмов: дрожжи *S. cerevisiae* ВКМУ-2549 и *N. crassa* ВКМФ-184 дикого типа. Получение биомассы клеток дрожжей, их разрушение и выделение постмитохондриального супернатанта при помощи стеклянных бус проводили, как описано ранее [6]. Споры *N. crassa* проращивали в жидкой среде по Чапеку при активной аэрации, биомассу собирали и растирали со стеклянным порошком, добавляя к 1 г биомассы 1 мл буфера. Буфер для гомогенизации биомассы дрожжей и нейроспоры содержал 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 100 мМ ацетат калия, 2 мМ ацетат магния, 2 мМ дитиотреитол, 0,5 мМ фенилметилсульфонилфлюорид. После центрифугирования гомогената при 30 000 g пипеткой Пастера отбирали 2/3 надосадочной жидкости и наносили на колонку с сефадексом G-25, уравновешенным тем же буфером с добавлением 20 % глицерина. В экспериментах использовали реактивы производства «Calbiochem» (США), <sup>14</sup>C-фенилаланин (13 ГБк/мМ) — ЧСФР и поли(dT) — НИКТИ БАВ (Бердск, РФ). Полинуклеотиды транслировали в пробах объемом 50 мкл, содержащих 30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ ацетат калия, 16 (для системы из дрожжей) или 8 мМ ацетат магния (для системы из нейроспоры), 2 мМ дитиотреитол, 2 мМ АТФ, 0,8 мМ ГТФ, 20 мМ креатинфосфат, 1,5 мкг креатинфосфокиназы, 40 мкМ <sup>14</sup>C-фенилаланин, 25 мкг поли(U) или 2,5 мкг поли(dT), 1,0 ед. A<sub>260</sub> S<sub>300</sub>-фракций из *N. crassa* и *S. cerevisiae*. При изучении влияния ингибиторов трансляции в пробы после 10 мин инкубации вносили 1 мМ хлорамфеникол или 1 мМ циклогексамид, а затем инкубировали еще 30 мин. В других случаях инкубацию проводили в течение 30 мин при 25 °С. Количество синтезированного полифенилаланина определяли по радиоактивности ТХУ-нерастворимого осадка, измеренной на счетчике SL40 («Intertechnique», Франция) в системе толуол — РРО — РОРОР с эффективностью 50 %.

Таблица 1.

Влияние хлорамфеникола и циклогексамида на трансляцию поли(U) и поли(dT) в бесклеточной белоксинтезирующей системе из *S. cerevisiae*.

Условия инкубации проб	Включение <sup>14</sup> C-фенилаланина в продукт трансляции поли(U), имп/мин	Включение <sup>3</sup> H-фенилаланина* в продукт трансляции поли(dT), имп/мин
10 мин инкубации с матрицей без антибиотика	16 636	47 618
То же в течение 40 мин	56 496	201 545
30 мин инкубации с матрицей в присутствии 1 мМ хлорамфеникола	56 961	199 699
То же с 1 мМ циклогексамидом	15 928	48 101

Примечание. Антибиотики добавляли в пробы через 10 мин после начала инкубации. \* Использовали смесь <sup>3</sup>H-фенилаланина с <sup>12</sup>C-фенилаланином в соотношении 1 : 10, общая концентрация фенилаланина в пробе 40 мкМ.

**Результаты и обсуждение.** В табл. 1 представлены данные о влиянии хлорамфеникола и циклогексамида на трансляцию поли(U) и поли(dT) в бесклеточной системе из дрожжей *S. cerevisiae*. Отсутствие какого-либо эффекта со стороны хлорамфеникола подтверждает то, что препараты бесклеточных белоксинтезирующих систем не содержат примесей митохондриальных рибосом, а полное ингибирование включения фенилаланина в продукт трансляции поли(U) и поли(dT) 1 мМ циклогексамидом свидетельствует о трансляции обеих матриц цитоплазматическими рибосомами. Мы обнаружили также, что опти-

Таблица 2

Влияние различных концентраций неомицина на эффективность трансляции поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *S. cerevisiae* и *N. crassa*

Условия проведения трансляции	<i>S. cerevisiae</i>		<i>N. crassa</i>	
	Включение <sup>14</sup> C-фенилаланина в продукт трансляции, имп/мин		Включение <sup>3</sup> H-фенилаланина в продукт трансляции, имп/мин	
	поли (U)	поли (dT)	поли (U)	поли (dT)
Трансляция в отсутствие антибиотика	240 021	12 431	1 355 566	36 762
Трансляция в присутствии неомицина (мМ):				
25	99 723	3 326	1 053 141	12 876
50	62 321	922	691 793	3 014
100	11 485	0	124 708	764

мальными концентрациями ионов магния для трансляции поли(U) и поли(dT) в бесклеточной системе из дрожжей и нейроспоры являются 16 и 8 мМ соответственно. Результаты влияния различных концентраций неомицина на трансляцию обеих матриц в бесклеточных белоксинтезирующих системах представлены в табл. 2. Оказалось, что неомицин угнетающе действует на трансляцию обеих матриц, причем в случае использования поли(dT) в большей степени, чем при трансляции поли(U). Сравнение этих результатов с данными, полученными ранее для бесклеточных белоксинтезирующих систем из прокариот и высших эукариот [3—5], позволяет сделать предположение о том, что декодирующий центр рибосомы претерпел в ходе эволюции изменения в направлении, во-первых, потери специфичности во взаимодействии с неомицином и, во-вторых, приобретения строгой избирательности по отношению к структуре сахаро-фосфатного остова матрицы. В этом случае рибосомы из грибов занимают промежуточное положение между прокариотами и высшими эукариотами, то есть способны транслировать поли(dT) под воздействием ионов магния, но не способны к переключению синтеза с рибона дезоксирибоматрицу при действии неомицина.

**Summary.** The effect of different concentration of neomycin on poly(U) and poly(dT) translation has been studied in cell-free systems from *S. cerevisiae* and *N. crassa*. The data show that this translation is carried out by cytoplasmic ribosomes. Mg<sup>2+</sup> ions stimulate poly(U) and poly(dT) translation in these systems and neomycin unlike the prokaryotic cell-free systems inhibits translation of both templates. It was proposed that ribosome decoding center was changing during evolution to higher stereospecificity to the codon-anticodon sugar-phosphate backbone structure.

## 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. Потанов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.— 1985.— 46, № 1.— С. 63—77.
3. Role of a 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. Elskaya // J. Mol. Biol.— 1988.— 203, N 4.— P. 885—893.
4. Гройсман И. С., Потанов А. П. Влияние мутаций белка S12 рибосом *Escherichia coli* на эффективность трансляции дезоксирибонуклеотидной матрицы поли(dT) // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 6.— С. 101—104.
5. Сравнительное изучение матричной активности поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *Escherichia coli* и зародышей пшеницы / А. П. Потанов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.— 1988.— 4, № 3.— С. 133—138.
6. Tuite M. F., Plesset J. mRNA-dependent yeast cell-free translation systems: theory and practice // Yeast.— 1986.— 2, N 1.— P. 35—52.

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

Получено 30.01.92