

Е. Б. ЛИШНЕВСКАЯ, В. И. ГЕЛЬФАНД, академик А. С. СПИРИН
**ДЕЙСТВИЕ АМИНОГЛИКОЗИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ
И СПЕРМИДИНА НА СТАБИЛЬНОСТЬ АССОЦИАЦИИ
РИБОСОМНЫХ СУБЧАСТИЦ**

Целью настоящего исследования было изучить влияние ряда антибиотиков аминогликозидной группы на стабильность 50S—30S-ассоциатов, полученных из промытых раствором хлористого аммония рибосомных субчастиц *E. coli*.

Ранее на неочищенных тотальных препаратах рибосом *Escherichia coli* было показано стабилизирующее действие антибиотиков — стрептомицина, канамицина, и неомицина (¹, ²), а также спермина и спермидина (²⁻⁶). Однако в непромытых рибосомах ассоциация субчастиц осложняется присутствием субстратов, продуктов и факторов белкового синтеза, и в частности аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК (⁷, ⁸). В виду этого для выявления влияния аминогликозидных антибиотиков и спермидина на собственное сродство двух рибосомных субчастиц друг к другу необходимо было в качестве объекта взять так называемые «незаряженные» (лишенные аминоацил-тРНК, пептидил-тРНК и факторов) рибосомы, которые можно получить реассоциацией чистых субчастиц.

В работе были взяты следующие антибиотики: стрептомицин, спектиномицин, канамицин и неомицин. В дополнение было испытано также действие неантибиотического полиаминного агента — спермидина. О стабильности ассоциации судили по концентрации Mg^{2+} , при которой происходит диссоциация 70S-частиц (50S—30S-ассоциатов) на субчастицы в присутствии соответствующего антибиотика или агента (принимая, что чем стабильнее ассоциат, тем более низкая концентрация Mg^{2+} требуется для его диссоциации).

Рибосомы получали из бактерий *E. coli*, штамм MRE-600, диссоциировали на 50S- и 30S-субчастицы в 0,5 *M* NH_4Cl , приготовленном на 0,01 *M* трис-буфере с 0,001 *M* $MgCl_2$, pH 7,3. Субчастицы разделяли в сахарозном градиенте, приготовленном на том же буфере, путем центрифугирования в зональном роторе В-XIV или В-XV центрифуги MSE SS-65 (Англия). Из фракций сахарозного градиента рибосомальные субчастицы осаждали с помощью $(NH_4)_2SO_4$ (⁹). Более подробно методика получения 50S- и 30S-субчастиц была описана ранее (⁷).

Перед опытом 50S- и 30S-субчастицы собирали из-под $(NH_4)_2SO_4$ центрифугированием (скорость 16 000 об/мин, время 20 мин.), и полученные осадки суспендировали в стандартном буфере: 0,01 *M* трис-HCl, 0,02 *M* $MgCl_2$, 0,1 *M* NH_4Cl , pH 7,3. Суспензию тщательно диализовали против этого буфера при 4° С. После диализа растворы с субчастицами осветляли при 16 000 об/мин (20 мин.). Концентрацию 50S субчастиц приводили к 1,32 мг/мл, а 30S-субчастиц — к 0,66 мг/мл. Для реассоциации субчастиц равные объемы суспензии 50S- и 30S-частиц сливали и инкубировали 30 мин. при 20°. Аминогликозидные антибиотики и спермидин добавляли к смеси 50S- и 30S-субчастиц до конечной концентрации 0,0001 *M*.

Для изучения диссоциации образованных 50S—30S-пар при понижающихся концентрациях Mg^{2+} аликвоты по 0,2 мл исходной суспензии вносили в серию пробирок, содержащих по 1,8 мл раствора 0,01 *M* трис-буфера — 0,1 *M* NH_4Cl (pH 7,3) с изучаемым агентом в концентрации

10^{-4} M и таким количеством $MgCl_2$, чтобы его конечная концентрация была 0,02; 0,01; 0,009; 0,008; 0,007; 0,006; 0,005; 0,004 и 0,003 M, соответственно; внесение аликвоты 0,2 мл в 1,8 мл раствора без $MgCl_2$ давало конечную концентрацию $MgCl_2$ 0,002 M. Конечная концентрация рибосом всюду была 0,1 мг/мл. Все образцы после инкубации в течение 30 мин. при 20° подвергали седиментационному анализу в ультрацентрифуге Спинко, модель E, при 42 040 об/мин в 12-миллиметровых стандартных аналитических ячейках с использованием ультрафиолетового абсорбционного метода. Из полученных седиментационных денситограмм рассчитывали количество недиссоциированного 50S — 30S-ассоциата и свободных 50S- и 30S-субчастиц. Долю недиссоциированного 50S — 30S-ассоциата (68S-компонент) откладывали на графике против соответствующих концентраций Mg^{2+} .

В качестве препаратов аминогликозидных антибиотиков были взяты: спектиномицин-сульфат, любезно предоставленный д-рами Л. Горини и Р. Зиммерманом (Гарвардская медицинская школа, США), стрептомицинсульфат и неомидинсульфат Московского завода медпрепаратов № 2 и канамицин сульфат Химфармзавода им. Л. Я. Карпова (Москва). Спермидин был фирмы «Серва» (ФРГ). Все перечисленные агенты были испытаны в концентрации 10^{-4} M.

В контрольной серии экспериментов изучалась диссоциация 50S — 30S-ассоциатов в буфере 0,01 M трис-HCl — 0,1 M NH_4Cl с убывающими концентрациями $MgCl_2$. Доля 50S — 30S-ассоциатов при 0,02 M $MgCl_2$ составляла ~ 80%, некоторое количество 50S- и 30S-субчастиц оставалось неспособным к ассоциации 50S—30S ассоциат имел седиментационный коэффициент ($s_{20, w}$) около 68 (± 1) S. Понижение концентрации Mg^{2+} от 0,02 до 0,01 M приводило к незначительной диссоциации 50S — 30S-ассоциатов. Дальнейшее уменьшение концентрации Mg^{2+} до 0,004 M вызывало полную диссоциацию рибосом на 50S- и 30S-субчастицы. Полудиссоциация наблюдалась в районе 0,007 M Mg^{2+} . Данные этой контрольной серии опытов представлены на рис. 1, 1.

Из всех изученных антибиотиков канамицин и неомидин по своему действию на 50S—30S-ассоциат оказались самыми сильными. В их присутствии при всех изученных концентрациях Mg^{2+} количество 50S — 30S-ассоциатов было постоянным и составляло 82—85%; диссоциация на субчастицы не наступала даже в 0,002 M Mg^{2+} (рис. 1, 2 и 3). Таким образом, эти два антибиотика из аминогликозидной группы являются очень сильными стабилизаторами ассоциации субчастиц в рибосоме.

Добавление стрептомицина в инкубационную смесь также заметно влияет на Mg^{2+} -зависимость диссоциации рибосом (рис. 1, 4). Снижение

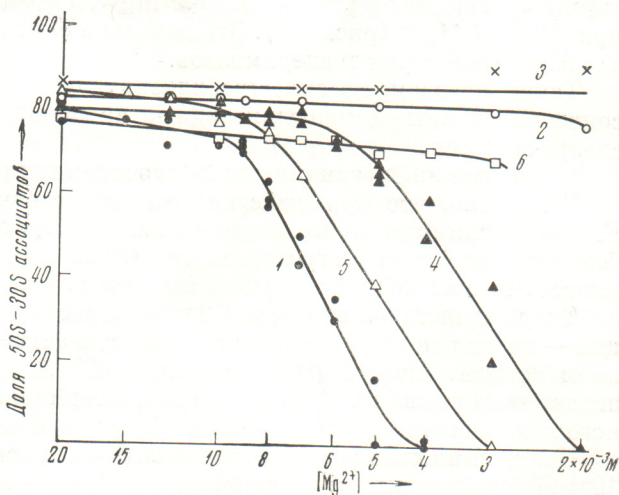


Рис. 1. Относительное содержание 50S — 30S-ассоциатов в зависимости от концентрации Mg^{2+} в присутствии аминогликозидных антибиотиков ($0,0001$ M) и спермидина ($0,0001$ M) по данным аналитического ультрацентрифугирования: 1 — контроль (без антибиотика и спермидина), 2 — канамицин, 3 — неомидин, 4 — стрептомицин, 5 — спектиномицин, 6 — спермидин. Во всех пробах всегда присутствует $0,1$ M NH_4Cl и $0,01$ M трис-HCl-буфер, pH 7,3

концентрации Mg^{2+} вплоть до $0,007 M$ существенным образом не сказывается на количестве 50S — 30S-ассоциата. Состояние полудиссоциации сменяется в область $0,004 M Mg^{2+}$, когда в контрольной серии в этих условиях можно наблюдать только 50S- и 30S-субчастицы. И наконец, полная диссоциация на субчастицы наступает при снижении концентрации Mg^{2+} до $0,002 M$. Значительно более слабым, чем у стрептомицина, стабилизирующим действием на рибосомный ассоциат обладает спектиномицин, взятый в тех же концентрациях. Состояние полудиссоциации рибосом в его присутствии наблюдается в районе $0,006 M Mg^{2+}$, а полная диссоциация наступает при $0,003 M Mg^{2+}$ (рис. 1, 5). Это довольно близко к тому, что наблюдается в контрольной серии экспериментов.

Таким образом, по силе стабилизирующего действия на 50S — 30S-ассоциат изученные аминогликозидные антибиотики можно расположить в следующий ряд:

неомицин > канамицин > стрептомицин > спектиномицин

Интересно, что при действии на бесклеточные рибосомные системы *E. coli* канамицин и неомицин вызывают эффект ложного кодирования, более сильный, чем у стрептомицина (¹⁰), а спектомицин, наоборот, не вызывает ложного кодирования или вызывает лишь слабое (¹¹).

Спермидин в концентрации $10^{-4} M$ по своему действию похож на неомицин — он сильно стабилизирует связь субчастиц в ассоциате: с уменьшением концентрации Mg^{2+} от 0,02 до $0,003 M$ доля 50S — 30 S-ассоциата падает всего лишь на 10% (рис. 1, 6). Спермидин также дает эффект ложного кодирования на рибосомах в бесклеточной системе (¹²).

Итак, аминогликозидные антибиотики и спермидин в концентрации $10^{-4} M$ стабилизируют ассоциацию рибосомных субчастиц в рибосомах *E. coli*. Эта стабилизация обусловлена усилением собственной связи субчастиц друг с другом, а не увеличением стабилизирующего вклада аминок-ацил-тРНК, пептидил-тРНК или иных компонентов, могущих присутствовать в рибосомах. Канамицин и неомицин вызывают более сильный стабилизирующий эффект, чем стрептомицин. Спектиномицин дает лишь небольшую стабилизацию.

Приносим глубокую благодарность Н. Г. Коровянскому за техническое обеспечение опытов на аналитической ультрацентрифуге, Ю. О. Сазыкину, Л. Горини и Р. А. Зиммерману — за предоставление препаратов антибиотиков и Н. А. Барулиной — за препараты рибосомных субчастиц.

Институт белка
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
23 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. A. Leon, T. D. Brock, *J. Mol. Biol.*, **24**, 391 (1967). ² J. Suzuki, M. Hori, H. Umezawa, *J. Antibiotics (Japan)*, **21**, 571 (1968). ³ S. S. Cohen, J. Lichtenstein, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2112 (1960). ⁴ N. Silman, M. Artman, H. Engelberg, *Biochim. et biophys. acta*, **103**, 231 (1965). ⁵ S. Pestka, *J. Biol. Chem.*, **241**, 367 (1966). ⁶ J. W. Norton, V. A. Erdmann, E. J. Herbst, *Biochim. et biophys. acta*, **155**, 293 (1968). ⁷ N. V. Belitsina, A. S. Spirin, *J. Mol. Biol.*, **52**, 45 (1970). ⁸ А. С. Спирин, М. Ю. Сафронова, Б. Сабо, *Молекул. биол.*, **4**, 618 (1970). ⁹ C. G. Kurland, *J. Mol. Biol.*, **18**, 90 (1966). ¹⁰ J. Davies, B. D. Davis, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3312 (1968). ¹¹ P. Anderson, J. Davies, B. Davis, *J. Mol. Biol.*, **29**, 203 (1967). ¹² S. M. Friedman, I. B. Weinstein, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**, 988 (1964).