

Г. Н. ЗАЙЦЕВА, В. А. ЧУГУНОВ, А. Т. ШИРШОВ

**ДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ НА БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИЕ
СИСТЕМЫ КИНЕТОПЛАСТА И ЦИТОПЛАЗМЫ ЗООФЛАГЕЛЛЯТА
STRIGOMONAS ONCOPELTI**

(Представлено академиком А. Н. Беловерским 14 VIII 1970)

На основании электронномикроскопического, цитохимического и функционального изучения кинетопласта у представителей трипанозомид была установлена митохондриальная природа этой органеллы (^{1, 2}). Нами было показано (³), что кинетопласт, являющийся, по-видимому, специализированным митохондрионом клетки зоофлагеллята *Strigomonas oncopelti*, содержит ДНК, ДНК-подобную РНК и рибосомы. Таким образом, в кинетопласте *S. oncopelti*, как и в митохондриях других организмов, имеются компоненты, необходимые для синтеза белка.

В настоящее время способность изолированных митохондрий к белковому синтезу не вызывает сомнения. Особенностью митохондрий является то, что их белоксинтезирующая система отличается от цитоплазматической и напоминает бактериальную (⁴). Это сходство состоит в том, что синтез белка в митохондриях *in vitro* и в бактериях одинаково чувствителен к таким антибиотикам, как, например, пурамицин, актиномицин Д, хлорамфеникол, и устойчив к циклогексимиду. Напротив, цитоплазматическая белоксинтезирующая система ингибируется циклогексимидом и нечувствительна к хлорамфениколу (⁵). Кроме того, такой сильный ингибитор цитоплазматического белкового синтеза, как рибонуклеаза, не влияет на включение меченых аминокислот в белки митохондрий, что, по-видимому, связано с непроницаемостью их мембран для этого фермента.

Вследствие избирательности действия циклогексимида и хлорамфеникола широко используются для изучения различий белоксинтезирующего аппарата митохондрий и цитоплазмы у животных и растительных организмов. Однако существует лишь небольшое число работ, касающихся влияния этих антибиотиков на включение аминокислот в цитоплазматические и митохондриальные белки простейших. Было показано, что цитоплазматические рибосомы у различных представителей простейших *Crithidia* (*Strigomonas*) *oncopelti* (⁶), *Crithidia fasciculata* (⁷), *Euglena gracilis* (⁸), *Paramecium* (⁹), как и у других эукариота, устойчивы к действию хлорамфеникола и чувствительны к циклогексимиду и рибонуклеазе. Имеются также единичные сообщения о синтезе белка в изолированных митохондриях (^{10, 11}) и кинетосомах (¹²) у простейших. Так, при исследовании действия хлорамфеникола и хлортетрациклина на включение ³H-лейцина в белки митохондриальной и микросомальной фракций *Tetrahymena pyriformis* было установлено, что эти два антибиотика избирательно ингибируют белоксинтезирующую систему митохондрий (¹⁰).

В нашей работе проводилось сравнительное изучение влияния хлорамфеникола и циклогексимида на включение меченых аминокислот в белки изолированных кинетопластов и рибосом цитоплазмы *S. oncopelti*.

Подобное исследование может дать информацию, с одной стороны, о функциональных особенностях белоксинтезирующих систем цитоплазмы и кинетопласта зоофлагеллятов, а с другой — о возможном сходстве этих систем в кинетопласте и в митохондриях других эукариота.

Для работы использовали культуру лептомонадных форм *S. oncopelti*, выращенную в течение 70—90 час. на жидкой среде с аэрацией (¹³).

Таблица 1

Действие хлорамфеникола и циклогексимида на включение C^{14} -аминокислот в белок изолированных кинетопластов *S. opocelti*

Условия	Опыт № 1				Опыт № 2, C^{14} -лейцин	
	C^{14} -гидролизат белка хлореллы		C^{14} -лейцин		имп/мин на 1 мг белка	% ингибирования
	имп/мин на 1 мг белка	% ингибирования	имп/мин на 1 мг белка	% ингибирования		
Полная система	837	—	455	—	981	—
С хлорамфениколом	158	81	50	89	115	88
С циклогексимидом	785	6	410	2	998	—2
С хлорамфениколом и циклогексимидом	—	—	48	89	—	—
С РНКазой	—	—	—	—	901	8
Без энергетической системы	110	87	—	—	120	88

Примечание. Состав инкубационной среды (μ мол. в 1 мл). Опыт № 1: трис-НСI-буфер, рН 7,5 50; MgCl₂ 10; KCl 50; сахараза 250, β -меркаптоэтанол 5; K₂HPO₄ 5; фосфонолпириват (ФЭП, фирма Calbiochem) 5; АТФ 2; ЦТФ 0,1; ГТФ 0,5; УТФ 0,4 (все нуклеозидтрифосфаты фирмы Rabi Laboratories); фосфонолпириваткиназа (ФЭП-киназа) 20 μ г; кинетопласты—6 мг белка; C^{14} -гидролизат белка хлореллы 1 μ С (у.а. 40 мС/мм); C^{14} -лейцин 2 μ С (у.а. 49 мС/г). Опыт № 2: состав тот же, что и в опыте 1, за исключением ЭДТА 2 μ мол.; кинетопласты—3 мг белка; C^{14} -лейцин 1 μ С; РНКаза (Фирма Sigma) 20 μ г. В опытах № 1 и № 2 хлорамфеникола и циклогексимида (Фирмы Sigma) по 100 μ г. Результаты—среднее из двух повторностей.

Клетки разрушали при помощи стеклянных бус в среде А (трис-НСI-буфер рН 7,5 0,1 М, β -меркаптоэтанол 0,005 М, сахараза 0,25 М). Гомогенат разводили в 10 раз средой Б (та же, что среда А, но с 0,03 М трис-буфером). Неразрушенные клетки, ядра, биполярные тельца и «тяжелые» мембраны осаждали 3-кратным центрифугированием при 1000 г в течение 10 мин. и отбрасывали. Из надосадочной жидкости «сырую» фракцию кинетопластов получали центрифугированием при 4500 г в течение 15 мин. Фракцию загрязненных мембранами кинетопластов суспендировали в среде Б и обрабатывали рибонуклеазой (50 μ г/мл, $t = 20^\circ$, 30 мин.). Затем кинетопласты промывали дважды средой Б при тех же условиях. В результате получали фракцию очищенных от цитоплазматических рибосом кинетопластов, в которые включали C^{14} -лейцин и C^{14} -гидролизат белка хлореллы (опыт № 1). Кроме того, мы проводили включение C^{14} -лейцина в кинетопласты, очищенные от мембран центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахаразы (опыт № 2). Для этого суспензию «сырой» фракции кинетопластов наслаивали на поверхность 27 мл линейного градиента концентрации сахаразы (1,2 М—2,0 М) и центрифугировали в роторе SW-25-1 (центрифуга Spinco L-2) в течение 1 часа при 22 000 об/мин и температуре $+2^\circ$. Зону кинетопластов отсасывали пастеровской пипеткой, разводили в отношении 1:2 средой Б и осаждали при 15 000 г в течение 15 мин. (опыт № 2).

Из надосадочной жидкости после осаждения микросомальной фракции выделяли цитоплазматические рибосомы путем однократного центрифугирования при 157 000 г в течение 1 часа. Фракцию «рН 5 ферментов» получали по методу (14).

В целях предотвращения бактериального загрязнения выделение кинетопластов и цитоплазматических рибосом проводили по возможности в стерильных условиях. Все реактивы готовили на стерильной воде и хранили в замороженном состоянии.

Для включения C^{14} -гидролизата белка хлореллы и C^{14} -лейцина в нелетонерастворимые белки кинетопластов использовали среду (15) с небольшой модификацией. Состав среды для включения C^{14} -аминокислот в рибосомы цитоплазмы был взят нами из работ Честерса (6) с некоторыми изменениями. В тех вариантах опыта, где использовали хлорамфеникол

и циклогексимида, радиоактивные аминокислоты добавляли после 15 мин. преинкубации фракций кинетопластов и цитоплазматических рибосом с этими антибиотиками. Инкубацию с радиоактивными предшественниками проводили при 30° в течение 30 мин. с периодическим перемешиванием. Во всех опытах был поставлен контроль на адсорбцию радиоактивности.

Включение останавливали добавлением равного объема холодной 10% ТХУ, содержащей 200 $\mu\text{мол}$. смеси C^{12} -аминокислот (в случае C^{15} -гидролизата белка хлореллы) или 10 $\mu\text{мол}$. C^{12} -лейцина (для C^{14} -лейци-

Таблица 2

Действие хлорамфеникола и циклогексимида на белоксинтезирующую систему цитоплазмы *S. oncorpelti*

Условия	C^{14} -гидролизат белка хлореллы		C^{14} -лейцин	
	имп/мин на 1 мг белка	% ингибирования	имп/мин на 1 мг белка	% ингибирования
Полная система	10 067	—	5540	—
С хлорамфениколом	9750	3	5527	0,2
С циклогексимином	1817	82	1000	82
С рибонуклеазой	212	98	113	98
Без энергетической системы	357	96	202	96

Примечание. Состав инкубационной среды (в $\mu\text{мол}$. на 1 мл): трис-НСI буфер, рН 7,8 50; MgCl_2 6; KCl 50; β -меркаптоэтанол 5; ФЭП 5; АТФ 2; ЦТФ 0,25; ГТФ 0,25; УТФ 0,25; ФЭП-киназа 20 мг; рибосомы 1,25 мг белка; «рН 5-фракция» 1 мг белка; C^{14} -гидролизат белка хлореллы 1 $\mu\text{С}$; C^{14} -лейцин 1 $\mu\text{С}$; смесь C^{12} -аминокислот без лейцина 0,5 $\mu\text{мол}$; хлорамфеникол и циклогексимида — по 100 $\mu\text{г}$; РНКазы 20 $\mu\text{г}$. Результаты — среднее из двух повторностей.

на). Радиоактивный осадок несколько раз промывали холодной 5% ТХУ и обрабатывали 5% ТХУ при 90°, в течение 15 мин. Затем суспензию белка наносили на мембранные фильтры (Хемапол, ЧССР) с 3-кратной промывкой 5% ТХУ. Радиоактивность просчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике Mark-1 с эффективностью 70%.

В табл. 1 представлены данные по влиянию хлорамфеникола и циклогексимида на включение C^{14} -гидролизата белка хлореллы и C^{14} -лейцина в белки изолированных кинетопластов *S. oncorpelti*. При этом кинетопласты были выделены или дифференциальным центрифугированием с обработкой рибонуклеазой (опыт № 1), или очищены центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (опыт № 2).

Из табл. 1 видно, что хлорамфеникол почти полностью подавляет включение C^{14} -аминокислот (гидролизат белка хлореллы), а также C^{14} -лейцина в белок кинетопластов, в то время как циклогексимида практически не снижает включения. Инкубация кинетопластов с C^{14} -лейцином в присутствии обоих антибиотиков дает такое же низкое включение, как и при инкубации с одним хлорамфениколом. Отсюда следует, что включение меченой аминокислоты происходит в процессе синтеза белка, осуществляемого не цитоплазматическими, а кинетопластными рибосомами.

В опыте № 2 (табл. 1), где использовали кинетопласты, очищенные центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы, наблюдаясь наиболее интенсивное включение C^{14} -лейцина, что объясняется, вероятно, отсутствием балластных белков в препарате. Характер действия двух антибиотиков на белоксинтезирующую систему кинетопласта как в опыте № 1, так и № 2 был сходный. Интересно, что присутствие РНКазы в инкубационной среде привело лишь к незначительному снижению включения C^{14} -лейцина в изолированные кинетопласты. Отсутствие в среде энергетической системы (всех нуклеозидтрифосфатов, фосфоэнолизирува-

та и фосфоэнолпируваткиназы) в сильной степени подавляло включение меченых аминокислот, что указывает на зависимость процесса синтеза белка в изолированных кинетопластах от обеспеченности энергией в виде АТФ.

В табл. 2 приведены результаты действия двух антибиотиков на включение смеси C^{14} -аминокислот (гидролизат белка хлореллы) и C^{14} -лейцина в рибосомы цитоплазмы *S. oncopelti*. Полученные данные указывают, что цитоплазматические рибосомы, выделенные из клеток зоофлагеллята, устойчивы к хлорамфениколу, но весьма чувствительны к циклогексимиду. Без энергодающей системы и при наличии в инкубационной среде РНКазы цитоплазматические рибосомы не включают метку в белок.

Полученные нами результаты относительно действия антибиотиков на белоксинтезирующий аппарат цитоплазмы *S. oncopelti* хорошо согласуются с литературными данными (6).

Таким образом, рибосомы изолированных кинетопластов *S. oncopelti* оказались чувствительными к действию хлорамфеникола и устойчивыми к циклогексимиду. Влияние этих антибиотиков на рибосомы цитоплазмы и кинетопластов противоположно. Этот факт служит важным доводом в пользу существования автономного белоксинтезирующего аппарата в кинетопластах трипанозомид. Эти результаты могут свидетельствовать также о том, что рибосомы кинетопластов трипанозомид по ряду свойств сходны с рибосомами эукариота.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
10 VIII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. Д. Калининкова, Усп. совр. биол., 64, 75 (1967); Цитология, 11, 681 (1969). ² G. G. Hill, W. A. Anderson, J. Cell Biol., 41, 547 (1969). ³ В. А. Чугунов, Г. Н. Зайцева, ДАН, 192, 672 (1970). ⁴ S. Nass, Intern. Rev. Cytol., 25, 55 (1969). ⁵ D. B. Roodyn, D. Wilkie, In: The Biogenesis of Mitochondria, Great Britain, 1968. ⁶ J. K. Chesters, Biochim. et biophys. acta, 114, 385 (1966). ⁷ D. Kahan, A. C. Zahalsky, S. H. Hutner, J. Protozool., 15, 385 (1968). ⁸ J. Eisenstadt, G. Brawerman, Biochim. et biophys. acta, 80, 463 (1964). ⁹ A. H. Reisner, H. Macindoe, J. Gen. Microbiol., 47, 1 (1967). ¹⁰ J. Mager, Biochim. et biophys. acta, 38, 150 (1960). ¹¹ J. L. Rosenbaum, G. G. Holz, J. Protozool., 13, 115 (1966). ¹² G. R. Seaman, Biochim. et biophys. acta, 55, 889 (1962). ¹³ А. В. Ильин, А. В. Шульга и др., Докл. высш. школы, биол. науки, 9, 118 (1968). ¹⁴ M. B. Hoagland, E. B. Keller, P. Zamesnik, J. Biol. Chem., 218, 345 (1956). ¹⁵ H. Kuntzel, Nature, 222, 142 (1969).