

М. А. ГЛУХОВА, академик А. С. СПИРИН

## ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ—ИНГИБИТОРОВ ТРАНСЛЯЦИИ — НА КОДОН-ЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОАЦИЛ-тРНК С РИБОСОМНЫМИ 30 S СУБЧАСТИЦАМИ

В настоящей работе изучали влияние антибиотиков — ингибиторов трансляции, а также спермидина на кодон-зависимое связывание аминоксил-тРНК с изолированными рибосомными 30 S субчастицами. О влиянии антибиотика на процесс судили по изменению двух количественных критериев — константы связывания аминоксил-тРНК и доли «активных», т. е. способных связать аминоксил-тРНК, 30 S субчастиц.

Из литературы известно, что на связывание аминоксил-тРНК с рибосомами влияют тетрациклин, эдеин и некоторые антибиотики аминокликозидной группы, такие как стрептомицин, канамицин, неомидин (1). Однако литературные данные не содержат конкретных количественных характеристик процесса связывания; не ясно изменяется ли под влиянием антибиотика доля «активных» субчастиц, константа связывания аминоксил-тРНК или кинетика процесса.

Ранее нами был предложен метод, позволяющий определять количество «активных» частиц и одновременно константу связывания аминоксил-тРНК в различных условиях среды (2). Согласно этому методу, долю «активных» частиц и константу связывания определяли по кривым насыщения 30 S субчастиц  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК в присутствии поли-У (рис. 1, 2). По уровню плато судили о количестве частиц, способных войти в тройственный комплекс 30 S · поли-У · фенилаланил-тРНК, а по наклону кривой — о константе связывания ( $K=1/[\text{фенилаланил-тРНК}]_{1/2}$ , где  $[\text{фенилаланил-тРНК}]_{1/2}$  — концентрация свободной  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК в точке полунасыщения 30 S субчастиц).

30 S субчастицы получали методом зонального центрифугирования из рибосом *Escherichia coli* MRE-600 (3). Препарат 30 S субчастиц был гомогенен при анализе в ультрацентрифуге; по анализу в полной бесклеточной белок-синтезирующей системе примесь 50 S субчастиц составляла не более 2%. Перед опытом 30 S субчастицы, хранившиеся в виде осадка под  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , диализовали против 0,01 M трис-НСl буфера (рН<sub>25</sub> 7,1–7,2), содержащего 0,02 M MgCl<sub>2</sub> и 0,1 M KCl (3).

$^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК была получена ферментативным аминокислотированием тотальной тРНК *E. coli*  $^{14}\text{C}$ -фенилаланином с удельной активностью 513 С/моль (фирма «Амершем», Англия) (4). Удельная активность препаратов аминоксил-тРНК составляла 560 000 расп/мин·мг. Количество тРНК определяли по поглощению при 260 нм, считая, что 1 о.е. соответствует 44 мкг тРНК (5). В использованных препаратах  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК титрованием 30 S субчастицами определяли долю «активных», т. е. способных связаться с 30 S субчастицами, молекул. Активная доля составляла 78% в нашем препарате. Таким образом, препарат содержал 384 пмол. активной  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК на 1 мг тотальной тРНК.

Стандартная реакционная смесь для связывания  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК с 30 S субчастицами содержала в объеме 0,2 мл 0,01 M трис-НСl буфер (рН<sub>25</sub> 7,1–7,2), 0,005 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M KCl, 15 мкг (18,75 пмол.) 30 субчастиц, 2–160 мкг (0,7–60 пмол.) «активной»  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК, 15 мкг

(избыток) поли-У. Пробы инкубировали 30 мин. при 25°. Во всех случаях специально было показано, что этого времени достаточно для установления равновесия. Количество связанной  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК определяли по методу Ниренберга и Ледера (6) путем адсорбции комплексов 30S субчастицы  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК на нитроцеллюлозных фильтрах. Радиоактивность фильтров считали в стандартной смеси толуол-РРО-РОРОР в сцинтилляционном счетчике «Трикарб» (фирма Паккард, США).

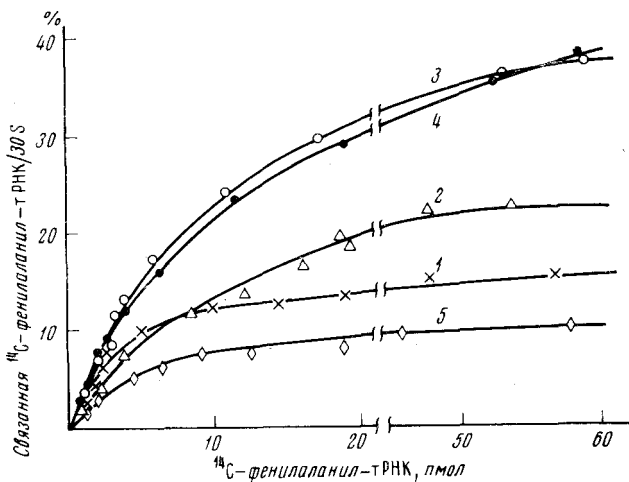


Рис. 1. Влияние антибиотиков — аминогликозидов на поли-У-зависимое связывание  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК с 30S субчастицей. 1 — контроль; 2 — стрептомицин,  $10^{-4}$  M; 3 — неомицин,  $5 \cdot 10^{-5}$  M; 4 — канамицин,  $5 \cdot 10^{-5}$  M; 5 — спектиномицин,  $10^{-6}$  M

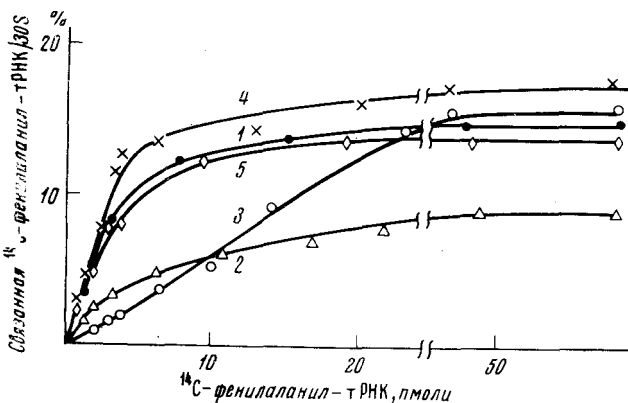


Рис. 2. Влияние некоторых антибиотиков и спермидина на поли-У-зависимое связывание  $^{14}\text{C}$ -фенилаланил-тРНК с 30S субчастицей. 1 — контроль; 2 — эдеин,  $10^{-7}$  M; 3 — тетрациклин,  $5 \cdot 10^{-4}$  M; 4 — спермидин,  $10^{-4}$  M; 5 — эритромицин,  $10^{-3}$  M

Для работы были взяты следующие антибиотики-ингибиторы трансляции: из группы аминогликозидов — стрептомицин сульфат, канамицин сульфат; неомицин сульфат, спектиномицин сульфат; тетрациклин, эдеин, хлорамфеникол, виридогризеин, эритромицин, а также спермидин. Препараты стрептомицина, неомицина, канамицина, тетрациклина, эритромицина и хлорамфеникола были предоставлены Ю. О. Сазыкиным (Институт антибиотиков Министерства медицинской промышленности РСФСР), спектиномицин — Л. Горини (Гарвардская медицинская школа, США), эдеин —

Влияние антибиотиков и спермидина на кодон-зависимое связывание фенилаланил-тРНК с рибосомными 30S субчастицами

Антибиотик	Концентрация, $M$	Доля «активных» 30S, %	$K, 1/M$	Антибиотик	Концентрация, $M$	Доля «активных» 30S, %	$K, 1/M$
—	—	15	$1,5 \cdot 10^8$	Тетрациклин	$10^{-4}$	15	$1,5 \cdot 10^8$
Стрептомицин	$10^{-6}$	15	$1,5 \cdot 10^8$	Эденн	$5 \cdot 10^{-4}$	16	$2 \cdot 10^7$
	$10^{-4}$	22	$2 \cdot 10^7$	Хлорамфеникол	$10^{-3}$	14	$1,5 \cdot 10^8$
Неомицин	$10^{-6}$	27	$8 \cdot 10^7$	Эритромицин	$10^{-3}$	14	$1,5 \cdot 10^8$
	$5 \cdot 10^{-5}$	38	$6 \cdot 10^7$	Виридогризеин	$10^{-5}$	16	$1,5 \cdot 10^8$
Канамицин	$5 \cdot 10^{-5}$	38	$6 \cdot 10^7$	Спермидин	$10^{-4}$	18	$2 \cdot 10^8$
Спектиномицин	$10^{-6}$	10	$6 \cdot 10^7$				
	$5 \cdot 10^{-4}$	10	$5 \cdot 10^7$				

фирмы «Полфа», Польша, виридогризеин — фирмы «Калбайокэм», США, спермидин — фирмы «Серва», ФРГ.

Концентрации антибиотиков в смеси были близки к тем, в которых данные антибиотики ингибируют трансляцию (4).

Результаты экспериментов представлены на рис. 1, 2 и в табл. 1. Из данных, приведенных в табл. 1, следует: 1) неомицин и канамицин более чем вдвое увеличивают долю активных частиц; константа связывания аминоацил-тРНК с 30S субчастицей при этом падает; 2) стрептомицин в концентрации  $10^{-4} M$  действует аналогично неомицину и канамицину, увеличивая количество активных частиц и понижая константу связывания; в концентрации  $10^{-6} M$  стрептомицин не эффективен; 3) спектиномицин понижает константу связывания и долю активных частиц; 4) тетрациклин не влияет на количество активных частиц, но константа связывания аминоацил-тРНК с 30S субчастицами резко падает при добавлении тетрациклина в концентрации  $5 \cdot 10^{-4} M$ ; 5) эденн уменьшает константу связывания и долю активных частиц; 6) хлорамфеникол, эритромицин, виридогризеин не влияют на константу связывания и количество активных частиц; 7) спермидин немного увеличивает долю активных частиц; константа связывания при этом почти не изменяется.

Итак, оказалось, что под влиянием антибиотиков могут изменяться и доля активных 30S частиц, и константа поли-У-зависимого связывания аминоацил-тРНК с 30S частицей. Однако эти показатели не всегда меняются симбатно. Так, неомицин, канамицин и стрептомицин ( $10^{-4} M$ ) увеличивают количество активных частиц, а константа связывания при этом, напротив, уменьшается. Тетрациклин, сильно понижая константу связывания, не влияет на долю активных частиц.

Интересно, что стрептомицин и тетрациклин ингибируют связывание аминоацил-тРНК только в концентрациях, существенно более высоких, чем это необходимо для ингибирования трансляции (табл. 1, а также (4)). Возможно, константа связывания этих антибиотиков с изолированной 30S субчастицей ниже, чем с 30S субчастицей в составе рибосомы, и тогда для проявления действия антибиотика необходим большой его избыток. Не исключено, однако, и то, что функция связывания аминоацил-тРНК не является единственной точкой приложения этих антибиотиков.

Авторы приносят глубокую благодарность Н. В. Белициной за постоянное внимание к работе.

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
5 XI 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> S. Pestka, Ann. Rev. Microbiol., v. 25, 487 (1971). <sup>2</sup> Н. В. Белицина, М. А. Глухова, А. С. Спирин, ДАН, т. 216, 925 (1974). <sup>3</sup> N. V. Belitsina, A. S. Spirin, J. Mol. Biol., v. 52, 45 (1970). <sup>4</sup> Л. П. Гагрилова, В. В. Смолянинов, Мол. биол., т. 5, 883 (1971). <sup>5</sup> C. G. Kurland, J. Mol. Biol., v. 18, 90 (1966). <sup>6</sup> M. Nirenberg, P. Leder, Science, v. 145, 1399 (1964).