

Л. П. ГАВРИЛОВА, О. Э. КОСТЯШКИНА, академик А. С. СПИРИН

## ОТСУТСТВИЕ ЛОЖНОГО КОДИРОВАНИЯ ПРИ «НЕЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ» ТРАНСЛЯЦИИ

Ложное кодирование — это ошибки, возникающие при включении аминокислот в полипептидную цепь в процессе ее синтеза на рибосоме, т. е. в процессе трансляции. Это явление обусловлено тем, что время от времени к кодону матричного полинуклеотида в рибосоме может присоединиться аминоацил-тРНК, не вполне соответствующая этому кодону по своей кодовой специфичности (<sup>1-3</sup>).

Обычно в системах с бактериальными рибосомами имеется определенный уровень ложного кодирования, но он резко повышается под действием стрептомицина и других аминогликозидных антибиотиков (<sup>1-3</sup>), а также при повышенных концентрациях  $Mg^{2+}$  (<sup>1, 4-6</sup>), при пониженных температурах (<sup>4, 5</sup>), в присутствии этанола (<sup>6, 7</sup>) и под действием еще некоторых факторов (<sup>3-8</sup>). Мутации тоже могут изменять рибосому таким образом, что ложное кодирование либо возрастает (*ram*-мутации), либо падает (*strA*-мутации) (<sup>9, 10</sup>). Но всегда, как при спонтанном («фоновом»), так и при индуцированном ложном кодировании в полипептидную цепь включаются лишь аминокислоты, ближайшие по кодовой специфичности к основной (кодируемой) аминокислоте. Так, при использовании полиуридиловой кислоты (полиУ) в качестве матричного полинуклеотида включение кодируемой аминокислоты — фенилаланина — сопровождается некоторым включением лейцина и изолейцина, и в значительно меньшей степени серина, тирозина и валина (<sup>1-3</sup>). Любое индуцированное увеличение ложного кодирования никогда не означает какого-либо принципиального изменения кодовой специфичности матричного полинуклеотида, а всегда лишь уменьшение избирательности в вышеуказанных пределах.

Ложное кодирование, как оказалось, обуславливается самой рибосомной частью (<sup>10, 11</sup>), и все факторы, его стимулирующие, действуют, по-видимому, не непосредственно на кодон-антикодоновое взаимодействие между тРНК и матричным полинуклеотидом, а на рибосому. Ответственным за эффект ложного кодирования оказался белок S12, локализованный в 30S субчастице: при его отсутствии в рибосоме ложное кодирование мало и не увеличивается ни в присутствии стрептомицина, ни под действием других факторов (<sup>12</sup>).

Этот же белок S12 оказался ответственным за ингибирующее действие стрептомицина на рибосому; так, трансляция полиУ в рибосомах, в которых отсутствует этот белок, не ингибируется стрептомицином (<sup>12, 13</sup>).

Недавно в нашей лаборатории было обнаружено, что отсутствие белка S12 сказывается еще на одной, очень важной стороне функционирования рибосомы: без этого белка оказывается разблокированной способность к спонтанной, т. е. не зависящей от фактора элонгации EF-G и ГТФ (так называемой «неэнзиматической»), транслокации (<sup>13</sup>).

Вместе с тем было показано, что способность к «неэнзиматической» транслокации стимулируется не обязательно удалением белка S12 из рибосомы, а также и обработкой рибосомы парахлормеркурибензоатом (ПХМБ) (<sup>14, 15</sup>), который просто модифицирует белок S12, не удаляя его из частицы (<sup>16, 17</sup>). Однако, в отличие от рибосом, лишенных белка S12,

рибосомы с ПХМБ-модифицированным белком S12 обнаруживают обычную чувствительность к ингибирующему действию стрептомицина (<sup>13</sup>). Следовательно, ПХМБ инактивирует функцию белка S12, обеспечивающую блокирование спонтанной транслокации, но не инактивирует другую функцию этого белка, обуславливающую чувствительность к стрептомицину. В настоящей работе мы показали, что ПХМБ-модифицированные рибосомы не обнаруживают ложного кодирования ни спонтанно, ни под действием стрептомицина. Таким образом, ложное кодирование сопряжено с той функцией белка S12, которая связана с транслокацией, и не имеет прямой зависимости от ингибирующего действия стрептомицина.

В работе использовали рибосомы *Escherichia coli*, штамм MRE-600, тщательно промытые 1 М NH<sub>4</sub>Cl с 0,01 М MgCl<sub>2</sub> и пересаживаемые (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (<sup>18</sup>). «Энзиматическая» система трансляции была сделана на буферной смеси 0,01 М трис-HCl — 0,1 М KCl — 0,01 М или 0,02 М MgCl<sub>2</sub> — 0,002 М дитиотреитол (ДТТ), pH 7,1, и в объеме 100 мкл содержала 20 мкг рибосом, 10 мкг полиУ, 65 мкг аминоацелированной тРНК, 40 мкг трансферных белковых факторов и 24 мкг ГТФ; в соответствующих опытных пробах присутствовал стрептомицин в концентрации 10<sup>-5</sup> мол/л; инкубацию проводили в течение 1 часа при 25°. «Неэнзиматическая» система трансляции (<sup>14</sup>, <sup>15</sup>) была приготовлена на буфере 0,01 М трис-HCl — 0,1 М KCl — 0,01 М или 0,02 М MgCl<sub>2</sub> — 10<sup>-4</sup> М ПХМБ, pH 7,1 и в объеме 50 мкл содержала 20 мкг рибосом, 10 мкг полиУ и 35 мкг аминоацелированной тРНК; в соответствующих опытных пробах присутствовал стрептомицин в концентрации 10<sup>-5</sup> мол/л; инкубацию вели в течение 5 час. при 25°. В качестве аминоацелированной тРНК использовали препарат тотальной тРНК *E. coli*, ферментативно ацелированной либо <sup>14</sup>C-фенилаланином (513 С/моль, Амершам, Англия), либо смесью <sup>12</sup>C-фенилаланина и <sup>14</sup>C-лейцина (342 С/моль, Амершам, Англия); полученный препарат <sup>14</sup>C-фенилаланил-тРНК имел удельную активность 1 010 000 расп/мин (890 пмол) на 1 мг тотальной тРНК, а препарат <sup>14</sup>C-лейцил-тРНК + <sup>12</sup>C-фенилаланил-тРНК — 2 250 000 расп/мин (2960 пмол) на 1 мг тотальной тРНК. После инкубации радиоактивность кислотонерастворимого продукта трансляции определяли как описано ранее (<sup>15</sup>, <sup>18</sup>).

Из данных табл. 1 видно, что нормальная «энзиматическая» трансляция полиУ сопровождается значительным ложным кодированием: наряду с полиУ-кодируемым фенилаланином включается также лейцин. В соответствии с известными из литературы данными (<sup>1-8</sup>), при более высокой концентрации Mg<sup>2+</sup> (0,02 М) процент ложного кодирования существенно выше, чем при более низкой (0,01 М) концентрации Mg<sup>2+</sup>, и стрептомицин стимулирует ложное кодирование в обоих случаях. Под действием стрептомицина и высоких концентраций Mg<sup>2+</sup> доля лейциновых остатков в продукте трансляции полиУ в наших опытах достигала 30% и более. (Отсутствие ингибирующего эффекта стрептомицина на включение фенилаланина в полиУ-зависимой бесклеточной системе или даже некоторый стимулирующий эффект согласуется с наблюдениями других авторов (<sup>2</sup>, <sup>3</sup>).)

Из табл. 2 видно, что совсем другая ситуация наблюдается при ПХМБ-стимулированной «неэнзиматической» трансляции. Здесь ни в одном случае не наблюдается столь заметного включения лейцина, как в «энзиматической» системе, т. е. эффект ложного кодирования очень мал или практически отсутствует. При этом весьма интересно, что ингибирующее действие стрептомицина на трансляцию, особенно при низком Mg<sup>2+</sup>, выражено вполне определенно.

Таким образом, с помощью ПХМБ удалось полностью разделить два эффекта стрептомицина — ингибирование трансляции и стимуляцию ложного кодирования. Из представленных опытов следует, что существуют два разных механизма вмешательства антибиотика в работу рибосомы.

Еще более интересным является то, что с помощью ПХМБ удается разделить разные функции белка S12. При этом функция блокирования спон-

танной транслокации в рибосоме и функция, от которой зависит ложное кодирование, оказались связанными, и ПХМБ инактивирует их одновременно, не затрагивая функции, обеспечивающей ингибирующий эффект стрептомицина.

Не исключено, что обе связанные функции — и блокирование спонтанной транслокации, и поддержание ложного кодирования — определяются каким-то одним и тем же рибосомным механизмом, существенную роль в котором играет белок S12. Ранее нами была предложена модель работы рибосомы, в которой транслокация осуществляется путем размыкания двух

Таблица 1

Ложное кодирование в «энзиматической» полиУ-зависимой системе трансляции (в присутствии трансферных факторов и ГТФ)\*

Концентрация Mg <sup>2+</sup> , мМ	Присутствие стрептомицина, 10 <sup>-3</sup> М	Включение аминокислот в ТХУ-нерастворимый пептид		Ложное кодирование, <sup>14</sup> C-Leu/ <sup>14</sup> C-Phe, %
		<sup>14</sup> C-Phe, пмол	<sup>14</sup> C-Leu, пмол	
10	—	25,6	1,4	5,5
	+	29,0	2,9	10,0
20	—	4,7	0,8	17,0
	+	5,6	1,8	32,1

\* Инкубация 1 час при 25°.

Таблица 2

Ложное кодирование в «неэнзиматической» (ПХМБ-стимулированной) полиУ-зависимой системе трансляции (в отсутствие трансферных факторов и ГТФ)\*

Концентрация Mg <sup>2+</sup> , мМ	Присутствие стрептомицина, 10 <sup>-3</sup> М	Включение аминокислот в ТХУ-нерастворимый пептид		Ложное кодирование, <sup>14</sup> C-Leu/ <sup>14</sup> C-Phe, %
		<sup>14</sup> C-Phe, пмол	<sup>14</sup> C-Leu, пмол	
10	—	1,87	0	0
	+	0,42	0	0
20	—	2,95	≤ 0,03	≤ 1
	+	2,46	0,01	0,4

\* Инкубация 5 час. при 25°.

рибосомных субчастиц (<sup>19</sup>, <sup>20</sup>). Оказалось, что эта же модель смыкания — размыкания рибосомы прекрасно объясняет механизм ложного кодирования (<sup>21</sup>). В терминах модели повышенная вероятность разомкнутого состояния рибосомы должна приводить одновременно к облегчению транслокации и к понижению ложного кодирования. В то же время про белок S12 стало известно, что он как-то участвует в ассоциации рибосомных субчастиц: будучи локализован на 30 S субчастице, он экранируется 50 S субчастицей от модификации внешними химическими и ферментативными агентами (<sup>22</sup>, <sup>23</sup>), он способен специфически связываться с 23 S РНК (<sup>24</sup>), иногда после диссоциации рибосомы он может быть обнаружен на 50 S субчастице (<sup>24</sup>), и, наконец, специфические антитела против белка S 12 ингибируют ассоциацию субчастиц (<sup>24</sup>). На основании всего вышесказанного можно предположить, что интактный белок S12 способствует смыканию рибосомных субчастиц и тем самым препятствует спонтанной транслокации и увеличивает ложное кодирование.

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
10 IX 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. Davies, W. Gilbert, L. Gorini, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 51, 883 (1964).  
<sup>2</sup> J. Davies, L. Gorini, B. D. Davis, J. Mol. Pharmacol., v. 1, 93 (1965). <sup>3</sup> S. Pestka, R. Marshall, M. W. Nirenberg, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 53, 639 (1965). <sup>4</sup> W. Szer, S. Ochoa, J. Mol. Biol., v. 8, 823 (1964). <sup>5</sup> S. M. Friedman, I. B. Weinstein, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 52, 988 (1964). <sup>6</sup> A. G. So, J. W. Bodley, E. W. Davie, Biochemistry, v. 3, 1977 (1964). <sup>7</sup> A. G. So, E. W. Davie, Biochemistry, v. 3, 1165 (1964).  
<sup>8</sup> M. Grunberg-Manago, J. Dondon, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 18, 517 (1965).

<sup>9</sup> R. Rosset, L. Gorini, J. Mol. Biol., v. 39, 95 (1969). <sup>10</sup> L. Gorini, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v. 34, 101 (1969). <sup>11</sup> L. Gorini, Nature New Biol., v. 234, 261 (1971). <sup>12</sup> M. Ozaki, S. Mizushima, M. Nomura, Nature, v. 222, 333 (1969). <sup>13</sup> L. P. Gavrilova, V. E. Koteliansky, A. S. Spirin, FEBS Letters, 1974. <sup>14</sup> L. P. Gavrilova, A. S. Spirin, FEBS Letters, v. 17, 324 (1971). <sup>15</sup> Л. П. Гаверилова, А. С. Спири́н, Молекул. биол., т. 6, 311 (1972). <sup>16</sup> Л. П. Гаверилова, В. В. Смолянинов, А. С. Спири́н, ДАН, т. 214, 705 (1974). <sup>17</sup> L. P. Gavrilova, A. S. Spirin, FEBS Letters, v. 39, 13 (1974). <sup>18</sup> Л. П. Гаверилова, В. В. Смолянинов, Молекул. биол., т. 5, 883 (1971). <sup>19</sup> А. С. Спири́н, ДАН, т. 179, 1467 (1968). <sup>20</sup> A. S. Spirin, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v. 34, 197 (1969). <sup>21</sup> В. С. Шварц, В. Н. Лыси́ков, ДАН, т. 217, 1446 (1974). <sup>22</sup> K.-H. Huang, C. R. Cantor, J. Mol. Biol., v. 67, 265 (1972). <sup>23</sup> R. V. Miller, P. S. Sypherd, J. Mol. Biol., v. 78, 539 (1973). <sup>24</sup> C. A. Morrison, R. A. Garrett, H. Zeichhardt, G. Stöffler, Molec. Gen. Genetics, v. 127, 359 (1973).