

10. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов.— М.: Химия, 1978.—584 с.
11. Singer B. UV spectral characteristics and acidic dissociation constants of 280 alkyl bases, nucleosides, and nucleotides // Handbook of biochem. and mol. biol.— London: CRC press, 1986.— Vol. 1.— P. 409—447.
12. Singer B. The chemical effect of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis // Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.— 1975.— 15.— P. 219—280.
13. Hemminki K., Ludlum D. V. Covalent modification of DNA by neoplastic agents // J. Nat. Cancer Inst.— 1984.— 73, N 5.— P. 1021—1028.
14. Изучение стабильности тиофосфамида в водных и водно-солевых растворах / Т. Л. Пятигорская, О. Ю. Жилкова, Н. М. Архангелова и др. // Хим.-фарм. журн.— 1984.— № 2.— С. 343—349.
15. Органическая химия нуклеиновых кислот / Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, Е. Д. Свердлов и др.— М.: Химия, 1970.—720 с.
16. Relative reactivities for monofunctional nitrogen mustard alkylation of nucleic acid components / C. C. Price, G. M. Gaucher, P. Koperu et al. // Biochim. et biophys. acta. — 1968.— 166, N 2.— P. 327—359.

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

Получено 02.02.87

SOME PROPERTIES OF THE REACTION BETWEEN POLYNUCLEOTIDES AND THIOPHOSPHAMIDE

Yu. V. Patshovskiy, T. P. Voloshchuk, A. I. Potopalsky

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The alkylation of ribonucleosides and polynucleotides with ethylene imine, monoaziridine, diethyl phosphate and antitumour agent thiophosphamide has been shown to change usually nucleobases residues. The preferential centres of the alkylation are nitrogen atoms in the positions 7 of guanosine, 1 of adenosine and 3 of pyrimidine nucleosides. The rate of DNA alkylation increases with a decrease of the ionic strength and pH and depends on the conformation and molecular mass of the molecules.

УДК 577.217.5:577.18.02

И. С. Гройман, А. П. Потапов

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ТОЧНОСТЬЮ ТРАНСЛЯЦИИ ПОЛИ(U) И ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ДЕКОДИРОВАНИЯ ПОЛИ(dT) В БЕСКЛЕТОЧНЫХ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ ИЗ ESCHERICHIA COLI

С использованием бесклеточных белоксинтезирующих систем из изогенных штаммов *E. coli*, различающихся мутациями в рибосомном белке S12, продемонстрировано наличие положительной корреляции между неоднозначностью трансляции поли(U) и эффективностью трансляции ее дезоксирибоналога поли(dT). Условия, вызывающие ошибки трансляции поли(U) — увеличение концентрации антибиотиков неомицина, канамицина, стрептомицина, ионов магния — стимулируют трансляцию поли(dT). Ряд активностей антибиотиков по стимулированию ошибочной трансляции поли(U) совпадает с рядом их активностей по стимулированию поли(dT)-зависимого синтеза полифенилаланина: неомицин > канамицин > стрептомицин. Более точные рибосомы с мутацией в белке S12 менее активны в трансляции поли(dT). Полученные данные хорошо соответствуют гипотезе о стереоспецифическом отборе кодон-антикодоновых комплексов на рибосоме.

Введение. Гипотеза стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов постулирует прямое взаимодействие декодирующего центра рибосомы с сахарофосфатным остовом кодон-антикодонового дуплекса как с единым целым [1, 2]. Один из путей проверки этого

предположения состоит в изучении особенностей декодирования матриц с измененной сахарофосфатной цепью, в частности, однотяжевых природных и синтетических ДНК, которые в обычных условиях практически не транслируются, но, в принципе, могут быть прочитаны рибосомами *E. coli* [3, 4]. Согласно данной гипотезе, возможность декодирования дезоксирибонуклеотидной матрицы, например поли(dT), связана с необходимостью изменения стереоспецифичности декодирующего центра рибосомы, с его деформацией, что скорее всего должно приводить к увеличению частоты ошибок отбора аминокислот-тРНК при трансляции соответствующего рибонуклеотидного аналога, поли(U).

Известно, что аминогликозидные антибиотики стрептомицин, канамидин и неомицин [5], повышенная концентрация ионов магния [6], мутации в рибосомном белке *S12* [8] способны изменять точность трансляции поли(U) в бесклеточных системах биосинтеза белка из *E. coli*. Эти же антибиотики, а также высокая концентрация Mg^{2+} стимулируют трансляцию поли(dT) [4, 9]. Нами показано, что мутационные изменения белка *S12* малой субчастицы 70S рибосом, снижающие частоту ошибок трансляции поли(U), снижают также эффективность трансляции поли(dT) (см. следующий номер).

Задача данной работы состояла в комплексном изучении влияния указанных факторов, индуцирующих ошибки трансляции поли(U), на эффективность трансляции поли(dT) и выявлении предполагаемой корреляции между глубиной индукции ошибочного включения лейцина в продукт трансляции поли(U) и эффективностью поли(dT)-зависимого синтеза полифенилаланина. Для этого исследовали влияние неомицина, канамидина и стрептомицина, а также высоких концентраций Mg^{2+} на трансляцию поли(U) и поли(dT) в бесконечных белоксинтезирующих системах из изогенных штаммов *E. coli*, различающихся мутацией в рибосомном белке *S12*. Таковыми были системы из штамма *xAc* и его производного *uL433*, существенно различающиеся по точности декодирования поли(U).

Материалы и методы. В экспериментах использовали поли(U) и трис фирмы «Reanal» (ВНР); 2-меркаптоэтанол — «Merck» (ФРГ); ГТР, АТР, креатинфосфат, креатинфосфокиназа (КФ 2.7.3.2), пурамицин, неомицин — «Calbiochem» (США); [^{14}C]фенилаланин (13 ГБк/ммоль), [^{14}C]лейцин (9 ГБк/ммоль) — СССР; поли(dT) — НИКТИ БЛВ (Бердск, СССР); суммарный препарат тРНК из *E. coli* — НПО «Биолар» (Олайне, СССР); стрептомицин — завод медпрепаратов (Киев, СССР); аминокислота — завод медпрепаратов (Ленинград, СССР); РРО, РОРОР, толуол, кислоты, щелочи, соли, агар — «осси» отечественного производства. Изогенные штаммы *E. coli*: исходный штамм *xAc* и производный от него штамм *uL433* с мутацией в рибосомном белке *S12* — *rpsL224* были любезно предоставлены Л. Исакссоном (Швеция). Биомассу *E. coli* выращивали согласно Миллеру [7], в качестве среды для выращивания культуры использовали аминокислоты. Фракцию S-30 *E. coli* получали по стандартной методике [4]. Материал хранили при $-70^{\circ}C$.

Трансляция синтетических полинуклеотидов. Пробы объемом 50 мкл содержали 30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 75 мМ KCl, переменные концентрации ионов магния, 2 мМ дитиотреитол, 2 мМ АТР, 0,1 мМ ГТР, 12 мМ креатинфосфат, 1,5 мкг креатинфосфокиназы, 60 мкМ [^{14}C]фенилаланин (в экспериментах по изучению точности трансляции поли(U) в пробу вносили 60 мкМ [^{14}C]фенилаланин и 60 мкМ [^{12}C]лейцин при определении уровня включения фенилаланина; 60 мкМ [^{12}C]фенилаланин и 60 мкМ [^{14}C]лейцин при определении ошибочного включения лейцина), 30 мкг поли(U) или 3 мкг поли(dT), 1 ед. A_{254} фракции S-30 из *E. coli*, 25 мкг суммарного препарата тРНК из *E. coli*. Пробы инкубировали в течение 60 мин. Количество синтезированного полифенилаланина определяли по радиоактивности ТХУ-нерастворимого осадка [10], измеренной на счетчике SL-40 («Intertechnique», Франция) в системе толуол — РРО — РОРОР с эффективностью 80 %.

Результаты и обсуждение. В бесклеточных системах из исходного штамма *xAc* и производного от него штамма *uL433* была проведена сравнительная оценка влияния мутации белка *S12* 70S рибосом *E. coli*

на ошибочное включение [^{14}C] лейцина в продукт трансляции поли(U) и эффективность трансляции поли(dT) в присутствии различных аминогликозидных антибиотиков и повышенной концентрации ионов магния. Активности использованных бесклеточных систем в поли(U)-зависимом синтезе полифенилаланина в отсутствие антибиотика были примерно одинаковыми.

Процентное содержание лейцина в продукте трансляции поли(U) при 10—100 мкМ неомицине в системе бесклеточного синтеза белка из исходного штамма составляло 56%, а из штамма мутанта — 30%, т. е. было примерно в 2 раза ниже, чем в системе из исходного штамма (рис. 2, а, б). Количество образующегося в тех же условиях продукта трансляции поли(dT) в системе из *xAc* превышало таковое в системе из *uL433* примерно в 2 раза (рис. 1). С учетом почти одинаковой исходной активности систем в трансляции поли(U) в отсутствие

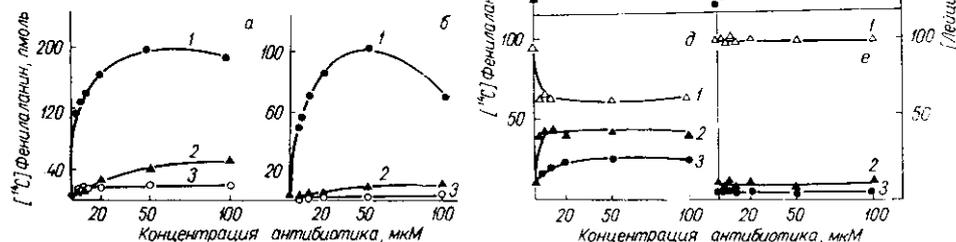


Рис. 1. Зависимость включения [^{14}C]фенилаланина в продукт трансляции поли(dT) от концентрации антибиотиков неомицина (1); канамицина (2) и стрептомицина (3) в бесклеточных системах из штаммов *E. coli* (а — *xAc*, б — *uL433*)

Fig. 1. The effect of antibiotics neomycin (1), kanamycin (2), streptomycin (3) concentration on poly(dT)-directed incorporation of [^{14}C]phenylalanine into TCA-precipitated product in the cell-free system from different strains of *E. coli*: а — *xAc*, б — *uL433*

Рис. 2. Зависимость включения [^{14}C]фенилаланина (1), [^{14}C] лейцина (2) в поли(U)-зависимый продукт трансляции и показателя точности трансляции поли(U) (3) от концентрации антибиотиков неомицина (а, б); канамицина (в, г) и стрептомицина (д, е) в бесклеточных системах биосинтеза белка из штаммов *E. coli* (а, в, д — *xAc*, б, г, е — *uL433*)

Fig. 2. The effect of antibiotics concentration on poly(U)-directed [^{14}C]phenylalanine (1), [^{14}C]leucine (2) incorporation into TCA-precipitated product and fidelity index of poly(U) translation (3) in the cell-free system from different strains of *E. coli*: а, в, д — *xAc*, б, г, ж — *uL433* (а, б) — неомицин, в, г — канамицин, д, ж — стрептомицин

антибиотика это свидетельствует о примерно в 2 раза более высокой эффективности трансляции поли(dT) в системе из *xAc*.

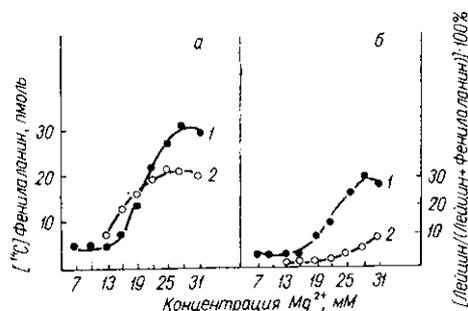
Эффективность трансляции поли(dT) в присутствии другого аминогликозидного антибиотика — канамицина — в бесклеточной системе трансляции из *xAc* была в 3—4 раза выше, чем в системе из штамма *uL433* (рис. 1). Это соответствовало столь же значительной разнице в доли ошибочного поли(U)-зависимого включения лейцина: 40% — в бесклеточной системе из *xAc* и 15% — в бесклеточной системе из *uL433* при 10—100 мкМ канамицине (рис. 2, в, г).

Стрептомицин не стимулировал трансляции поли(dT) (рис. 1, б), как и не повышал процентного содержания лейцина в продукте трансляции поли(U) в бесклеточной системе из резистентного к антибиотику мутантного штамма (рис. 2, е). В бесклеточной же системе трансляции из *xAc* незначительное стимулирование трансляции поли(dT) (рис. 1, а) соответствовало относительно небольшому увеличению доли ошибочно включаемого [^{14}C] лейцина в продукт трансляции поли(U) (рис. 2, д).

В обеих исследованных нами бесклеточных системах при концентрации ионов магния 19—31 мМ наблюдалось повышение процентного содержания лейцина в продукте трансляции поли(U). В этом же диапазоне концентрации ионов магния происходила незначительная стимуляция трансляции поли(dT) (рис. 3). При этом более высокое процентное содержание лейцина в продукте трансляции поли(U) соответствовало большей эффективности трансляции поли(dT) в системе из исходного штамма по сравнению с системой из штамма мутанта.

Рис. 3. Зависимость включения [¹⁴C]фенилаланина (1) в продукт трансляции поли(dT) и показателя точности трансляции поли(U) (2) от концентрации ионов магния в бесклеточных системах трансляции из штаммов *E. coli* (а — *xAc*, б — *uL433*)

Fig. 3. The effect of Mg²⁺ concentration on poly(dT)-directed incorporation of [¹⁴C]phenylalanine (1) into TCA-precipitated product and fidelity index of poly(U) translation (2) in the cell-free system from different strains of *E. coli*: (а — *xAc*, б — *uL433*)



Таким образом, изменения точности трансляции поли(U), индуцируемые различными антибиотиками и повышенной концентрацией ионов магния в бесклеточных системах трансляции из штамма мутанта *uL433* и исходного штамма *xAc*, хорошо коррелировали с различиями в эффективности трансляции поли(dT) этими двумя системами в присутствии тех же факторов.

В своей работе мы также сравнили глубину эффекта, оказываемого различными антибиотиками на аппарат трансляции *E. coli* в бесклеточных системах из штаммов *xAc* и *uL433*.

Из рис. 1, 2 видно, что в отличие от стрептомицина в действии канамицина и неомицина прослеживается более одной составляющей. При малых концентрациях антибиотиков хорошо выражена их специфичность действия на системы трансляции, состоящая в резком изменении параметров декодирования поли(U) и поли(dT). С увеличением концентрации неомицина и канамицина наблюдается неспецифическая инактивация всех изучаемых активностей системы. Это согласуется со сведениями о наличии на 70S рибосомах одного места связывания для стрептомицина и более одного — для неомицина и канамицина [9].

В бесклеточной системе трансляции из штамма *xAc* 20—100 мкМ неомицин почти полностью ингибировал трансляцию поли(U), эта же концентрация канамицина уменьшала эффективность трансляции поли(U) в 3—4 раза, а стрептомицина — примерно в 1,5 раза (рис. 2, а, в, д). В бесклеточной системе из *uL433* закономерность действия антибиотиков качественно сохранялась, но их эффект был менее ярко выражен. Так, та же концентрация неомицина ингибировала поли(U)-зависимый синтез фенилаланина в 3—4 раза, канамицина в 1,5—2 раза, а стрептомицин вовсе не оказывал действия на трансляцию поли(U). В системах из обоих штаммов: *xAc*, *uL433* активность антибиотиков по ингибированию поли(U)-зависимого синтеза полифенилаланина описывается рядом неомицин > канамицин > стрептомицин.

Процентное содержание лейцина в продукте трансляции поли(U) в бесклеточной системе трансляции из штамма *xAc* повышалось в 6 раз в присутствии 20—100 мкМ неомицина, в 4 раза в присутствии 20—100 мкМ канамицина, в 2 раза при аналогичной концентрации стрептомицина (рис. 2, а, в, д). Такая же тенденция в стимулировании ошибочного включения [¹⁴C] лейцина в продукт трансляции поли(U) различными антибиотиками сохранялась в бесклеточной белоксинтезирующей системе из штамма *uL433*, но величина эффекта была меньше. Так, процентное содержание лейцина в продукте трансляции поли(U) в

присутствии 20—100 мкМ неомицина увеличилось в 3 раза, канамицина в 2 раза, стрептомицин не вызывал увеличения доли ошибок при трансляции поли(U) (рис. 2, б, г, е). Активность антибиотиков по стимулированию ошибочной трансляции поли(U) описывается тем же рядом, что и ингибирование трансляции этой матрицы. Такая же закономерность: неомицин > канамицин > стрептомицин (рис. 1) соответствует активности антибиотиков по стимулированию трансляции поли(dT).

Полученные результаты позволяют заключить, что весьма различные по своей природе факторы, изменяющие точность декодирования поли(U), изменяют и эффективность декодирования поли(dT). Прослеживается отчетливая положительная корреляция между неоднозначностью трансляции рибонуклеотидной матрицы и эффективностью трансляции ее дезоксирибоаналога. По мере увеличения глубины индукции ошибок декодирования поли(U) в ряду неомицин > канамицин > стрептомицин, возрастания концентрации каждого антибиотика и повышения в среде содержания ионов магния, а также при переходе от рибосом с мутацией в белке *S12* к исходным рибосомам имеет место пропорциональное увеличение эффективности поли(dT)-зависимого синтеза полифенилаланина. Обнаруженная корреляция изменений точности трансляции рибонуклеотидной матрицы и эффективности трансляции дезоксирибонуклеотидной матрицы вряд ли случайна. Скорее всего, она отражает фундаментальную взаимосвязь указанных процессов. В соответствии с гипотезой стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов [1, 2] эта взаимосвязь определяется способом функционирования декодирующего центра рибосомы, а именно: его взаимодействием с сахарофосфатным остовом кодон-антикодового комплекса как единым целым.

Такая точка зрения находит свое подтверждение в наблюдаемых особенностях действия антибиотиков и ионов магния. В каждом отдельном случае — особенно ярко это прослеживается для антибиотиков — один и тот же агент вызывает закономерное и согласованное изменение сразу нескольких параметров системы: угнетение включения фенилаланина и, наоборот, стимуляцию включения лейцина в продукт трансляции поли(U), стимуляцию включения фенилаланина в продукт трансляции поли(dT). Такое действие антибиотиков на трансляцию поли(U) — хорошо известный факт [9]. Здесь же следует отметить, что эффективность трансляции поли(dT) в их присутствии вполне соизмерима с эффективностью трансляции поли(U) в их отсутствие. Иными словами, наблюдаемые эффекты не связаны с банальной инактивацией каких-либо компонентов системы трансляции, а отражают изменение правил отбора кодон-антикодоновых комплексов.

Действие указанных антибиотиков опосредовано воздействием на рибосому, о чем свидетельствует зависимость глубины эффекта от структурного состояния рибосомного белка *S12* (рис. 2), а также данные других авторов [5, 9]. Поэтому отмеченные изменения отбора кодон-антикодоновых комплексов, по-видимому, определяются деформацией структуры рибосом и в первую очередь их декодирующего центра. В результате комплексе «рибокодона» (поли(U)) с комплементарным антикодоном (тРНК^{Phe}) утрачивает свойство явной функциональной предпочтительности. Комплекс же «рибокодона» (поли(U)) с ошибочным, неспецифичным, антикодоном (тРНК^{Leu}) и в еще большей мере комплексе ошибочного «дезоксирибокодона» (поли(dT)) с комплементарным антикодоном (тРНК^{Phe}) узнаются и используются рибосомой с резко возросшей эффективностью. В соответствии с гипотезой стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов [1, 2] это свидетельствует об оценке рибосомой структуры кодон-антикодоновых комплексов и изменении правил такой оценки структуры комплексов в пользу некоторых нестандартных их вариантов.

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. McCarthy B. J., Holland J. J. Denaturated DNA as a direct template for *in vitro* protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1965.— 54, N 3.— P. 880—886.
4. The role of template sugar-phosphate backbone in ribosomal decoding mechanism / A. P. Potapov, K. A. Soldatkin, A. P. Soldatkin, A. V. Elskaya // J. Mol. Biol.— 1988.— 203, N 3— P. 885—893.
5. Сазыкин Ю. О. Антибиотики как биохимические реагенты // Биол. химия.— М.: ВИНТИ, 1984.— Т. 20.— С. 111—161.
6. Yarus M. The accuracy of translation // Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.— 1979.— 23.— P. 195—225.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1984.— 436 с.
8. Davis J., Gilbert L., Gorini L. Streptomycin, suppression and the code // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1964.— 51, N 5.— P. 883—890.
9. Молекулярные основы действия антибиотиков / Э. Гэйл, Э. Кандлифф, П. Рейнолдс и др.— М.: Мир, 1975.— 500 с.
10. Неоднозначность трансляции полирибидиловой кислоты транспортными РНК из различных эукариотических объектов / А. П. Солдаткин, Н. И. Желтовская, Г. В. Овчаренко, А. В. Ельская // Укр. биохим. журн.— 1983.— 55, № 6.— С. 603—607.

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

Получено 10.03.89

STUDIES IN CORRELATION BETWEEN POLY(U) MISREADING AND EFFICIENCY OF POLY(dT) TRANSLATION IN THE CELL-FREE PROTEIN-SYNTHESIZING SYSTEMS OF *E. coli*

I. S. Groisman, A. P. Potapov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The efficiency of poly(dT) translation and misreading of poly(U) has been studied in cell-free systems from wild-type *E. coli* and streptomycin-resistant mutants with altered ribosome protein *S12*. The data show that there is a positive correlation between poly(U) misreading and efficiency of poly(dT) translation. Conditions promoting misreading of poly(U): an increase in the concentration of neomycin, kanamycin, streptomycin antibiotics, of Mg^{2+} ions stimulate poly(dT) translation as well. A series of antibiotics activities in promotion of both poly(U) misreading and poly(dT) translation is the same: neomycin > kanamycin > streptomycin. The more accurate ribosomes with altered protein *S12* are less efficient in translation of poly(dT). The data obtained are in good agreement with the hypothesis on stereospecific stabilization of codon-anticodon complexes on the ribosome.

УДК 578.828.11:577.212.3

С. В. Шарун, А. П. Коваль, В. М. Кавсан

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 5'- И 3'-НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА MAV-1

Определены нуклеотидные последовательности 5'- и 3'-концевых участков, а также фрагмента средней части гена обратной транскриптазы (ревертазы) вируса-помощника MAV-1 из комплекса вируса миелобластома птиц. Сиквенированные фрагменты гена обладают высокой степенью гомологии с аналогичными участками генома вируса саркомы Рауса. В последовательности из 507 нуклеотидных остатков обнаружено только 15 замен, из которых шесть приводят к изменению кодируемого аминокислотного остатка.