

2. *Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis* / F. Casse, C. Boucher, J. S. Julliot et al. // *J. Gen. Microbiol.*— 1979.—113, N 2.— P. 229—242.
3. *Schleif R.* Assaying of organisms for the presence of restriction endonucleases // *Meth. Enzymol.*— 1980.—65.— P. 19—23.
4. *Roberts R. J.* Restriction and modification enzymes and their recognition sequences // *Nucl. Acids Res.*— 1985.—13.— Suppl.— P. 165—199.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Пущино

Получено 21.04.86

УДК 547.963.3

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНФОРМЕРОВ ДЕАЦИЛИРОВАННОЙ тРНК С 80S РИБСОМАМИ

Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Неактивные в аминоацилировании конформеры тРНК выделены из печени кроликов при некоторых состояниях, связанных с изменением биосинтеза белка в организме [1—3]. Изучены активационные параметры их ренатурации *in vitro* [4] и особенности образования комплекса с лейцил-тРНК-синтетазой [5]. Целью настоящей работы было исследование взаимодействия указанных конформеров тРНК с рибосомами из печени кролика. Эта задача актуальна и интересна, поскольку особенности взаимодействия тРНК с эукариотическими рибосомами до настоящего времени изучены крайне мало. Кроме того, исследование связывания биологически неактивных конформеров тРНК с рибосомами может дать информацию о принципиальной возможности их ингибирующего действия на белковый синтез на этапе трансляции.

Препараты тРНК из печени голодавших 10—12 сут и контрольных кроликов получали, как описано ранее [5]. Суммарный препарат тРНК из печени голодавших животных содержит смесь активных и неактивных в аминоацилировании тРНК (тРНК<sub>а+н</sub>), а из печени контрольных животных — активные конформеры (тРНК<sub>а</sub>). Деацилирование тРНК проводили по методу [6]. 40S и 60S субчастицы рибосом из печени кролика получали, как описано в [7]. [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК с удельной активностью 1520 пмолей [<sup>14</sup>C]фенилаланина на 1 ед. А<sub>260</sub>, обогащенная тРНК<sup>Phe</sup> и суммарная тРНК, лишенная фенилаланиновой тРНК (тРНК<sup>-Phe</sup>), были получены по методу [8]. Связывание аминоацил-тРНК с рибосомами изучали в системе, предложенной Ниренбергом и Ледером [9]. Смесь в объеме 50 мкл содержала 0,02 М трис-НСl, рН 7,6, 0,1 М NH<sub>4</sub>Cl, 0,02 М MgCl<sub>2</sub>, 5 пмолей 40S и 7,5 пмолей 60S субчастиц рибосом, 20 пмолей [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК, различные количества деацилированной тРНК и в ряде случаев 2 мкг поли(U). [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК добавляли после преинкубации смеси при 4 °С в течение 10 мин и затем инкубировали пробы еще 45—75 мин при той же температуре. Образовавшиеся комплексы сорбировали на нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Одним из способов исследования взаимодействия деацилированной тРНК с рибосомами является определение ее ингибиторного действия на связывание с рибосомами аминоацил- либо пептидил-тРНК [10, 11]. В настоящей работе взаимодействие рибосом с различными конформерами тРНК оценивали по степени ингибирования связывания [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК. Предварительно были определены оптимальные для матричнозависимого и безматричного связывания количества фенилаланил-тРНК и время инкубации.

На рис. 1, а представлены результаты исследования ингибирующего действия различных конформеров тРНК на поли(U)-зависимое связывание фенилаланил-тРНК с 80S рибосомами. Видно, что тРНК<sub>а+н</sub>

проявляет более выраженное ингибирующее действие по сравнению с тРНК<sub>а</sub>. Характеристические величины  $a_i$ , применяющиеся для оценки влияния различных ингибиторов на связывание аминоксил-тРНК с рибосомами [12], отличаются в два раза, составляя 0,31 и 0,13 для тРНК<sub>а+и</sub> и тРНК<sub>а</sub> соответственно. Ренатурация неактивных конформеров тРНК приводила к исчезновению обнаруженных различий.

Из рис. 1, б следует, что активные и неактивные конформеры тРНК практически не отличаются по степени ингибирования матричнозависимого

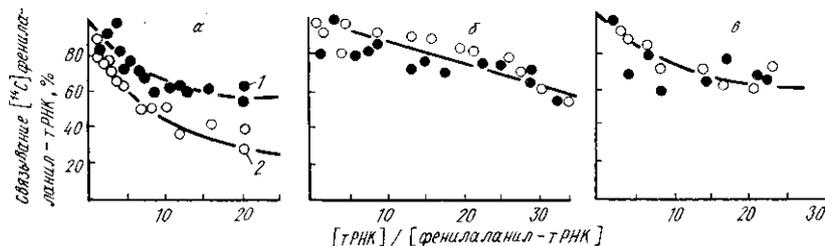


Рис. 1. Ингибирующее действие тРНК<sub>а</sub> (1) и тРНК<sub>а+и</sub> (2) на связывание [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК с рибосомами: а — поли(U)-зависимое связывание с 80S рибосомами; б — поли(U)-зависимое связывание с 40S субчастицами рибосом; в — безматричное связывание с 80S рибосомами. В каждом случае за 100 % принято количество [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК, связавшейся в данной системе с рибосомами в отсутствие деацилированной тРНК

Fig. 1. The inhibitory effect of tRNA<sub>a</sub> (1), tRNA<sub>a+i</sub> (2) on the binding of [<sup>14</sup>C]phenylalanyl-tRNA to ribosomes: а — poly(U)-dependent binding to 80S ribosomes; б — poly(U)-dependent binding to 40S ribosome subunits; в — binding to 80S ribosomes in the absence of poly(U). The quantity of [<sup>14</sup>C]phenylalanyl-tRNA bound to ribosomes in the absence of deacylated tRNA is taken as 100 %

мого связывания фенилаланил-тРНК с 40S субчастицами рибосом (значения  $a_i$  0,042 и 0,037 соответственно). Подобные данные о разном связывании конформеров тРНК<sup>Phe</sup> из *E. coli* с 70S рибосомами и 30S субчастицами были получены в работе [13]. По всей видимости, относи-

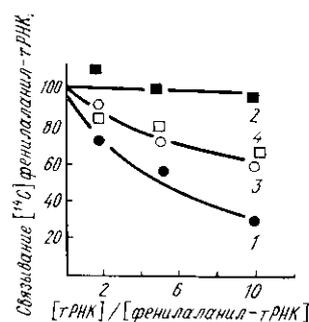


Рис. 2. Влияние на поли(U)-зависимое связывание [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК с 80S рибосомами препаратов тРНК<sub>а</sub><sup>Phe</sup> (1), тРНК<sub>а</sub><sup>-Phe</sup> (2), тРНК<sub>а+и</sub><sup>Phe</sup> (3) и тРНК<sub>а+и</sub><sup>-Phe</sup> (4). За 100 % принято количество [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК, связавшейся с рибосомами в отсутствие деацилированной тРНК

Fig. 2. The effect of tRNA<sub>a</sub><sup>Phe</sup> (1), tRNA<sub>a</sub><sup>-Phe</sup> (2), tRNA<sub>a+i</sub><sup>Phe</sup> (3) and tRNA<sub>a+i</sub><sup>-Phe</sup> (4) preparations on the poly(U)-dependent binding of [<sup>14</sup>C]phenylalanyl-tRNA to 80S ribosomes. The quantity of [<sup>14</sup>C]phenylalanyl-tRNA bound to ribosomes in the absence of deacylated tRNA is taken as 100 %

тельно небольшие изменения конформации тРНК не важны для связывания с малыми субчастицами рибосом, но весьма существенны для адсорбции на целых рибосомах.

При безматричном связывании фенилаланил-тРНК нами не было обнаружено различий в ингибирующем действии тРНК<sub>а+и</sub> и тРНК<sub>а</sub> (рис. 1, в). Поскольку в описанных экспериментах были использованы препараты суммарной деацилированной тРНК, возникает вопрос, является ли обнаруженный ингибиторный эффект при матричнозависимом связывании результатом связывания с рибосомой деацилированной тРНК<sup>Phe</sup> или деацилированные тРНК другой специфичности также способны ингибировать связывание фенилаланил-тРНК? Для его выяснения были получены обогащенные препараты тРНК<sup>Phe</sup> и препараты суммарной тРНК<sup>-Phe</sup>. Результаты представлены на рис. 2. Оказалось, что тРНК<sub>а</sub><sup>-Phe</sup> не оказывает влияния на связывание фенилаланил-тРНК с

рибосомами, в то время как тРНК<sub>а</sub><sup>Phe</sup> обладает выраженным ингибиторным действием. Следовательно, при данных концентрациях суммарной деацелированной тРНК<sub>а</sub> ингибиторный эффект полностью обусловлен кодонзависимым связыванием тРНК<sub>а</sub><sup>Phe</sup> с рибосомами. Иная картина наблюдалась в присутствии тРНК<sub>а+и</sub> — как тРНК<sup>Phe</sup>, так и тРНК<sup>-Phe</sup> обладали явным ингибиторным действием. Это свидетельствует о том, что в присутствии поли(U) взаимодействовать с рибосомами способны биологически неактивные конформеры тРНК различных специфичностей, а не только тРНК<sup>Phe</sup>. Отсюда понятен более выраженный ингибиторный эффект тРНК<sub>а+и</sub> по сравнению с тРНК<sub>а</sub>.

В наших экспериментах с 1 молем 80S рибосом связывалось до 2 молей [<sup>14</sup>C]фенилаланил-тРНК, т. е. адсорбция происходила на два сайта связывания. Однако в связи с трудностью точной дискриминации сайтов на эукариотической рибосоме мы не можем определить, связан ли повышенный по сравнению с контролем ингибиторный эффект тРНК<sub>а+и</sub> с более выраженным взаимодействием неактивных конформеров с обоими сайтами либо повышенным сродством к какому-то одному из них.

Таким образом, нами получены доказательства того, что неактивные в аминокислотировании конформеры тРНК способны связываться с 80S рибосомами и ингибировать кодонзависимое связывание аминокислот-тРНК, что может быть одним из факторов нарушения биосинтеза белка при тех экстремальных состояниях организма, для которых характерно появление неактивных конформеров тРНК.

#### THE INTERACTION OF DIFFERENT CONFORMERS OF DEACYLATED tRNA WITH 80S RIBOSOMES

*B. S. Negrutsky, A. V. Elskaya*

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

#### Summary

Biologically inactive tRNA conformers are able to inhibit the poly(U)-dependent binding of phenylalanyl-tRNA to 80S ribosomes, being a more efficient inhibitor than native deacylated tRNA.

1. Биологически неактивные транспортные РНК животных / Г. Х. Мацука, Т. П. Бабий, Э. Б. Сквирская и др. // Биохимия.— 1973.—38, № 6.— С. 1221—1227.
2. Демидов С. В., Коваленко М. И., Ельская А. В. Изучение биологической активности тРНК печени кроликов разного возраста // Биол. науки.— 1980.— № 12.— С. 18—24.
3. Изучение молекулярных основ нарушения биосинтеза белка при экспериментальном инфаркте миокарда и аутолизе миокарда / М. И. Коваленко, Г. А. Родовичюс, А. И. Тамулявичюс и др. // Молекуляр. биология.— 1984.— Вып. 37.— С. 18—21.
4. Негруцкий Б. С., Солдаткин К. А. Термодинамическая оценка конформационных переходов при ренатурации биологически неактивных конформеров тРНК // Там же.— С. 26—28.
5. Негруцкий Б. С., Ельская А. В. Особенности тепловой инактивации лейцил-тРНК-синтазы из печени кролика в присутствии различных конформеров тРНК // Молекуляр. биология.— 1984.—18, № 5.— С. 1297—1300.
6. Sarin P., Zamechnic P. On the stability of aminoacyl-sRNA to nucleophilic catalysis // Biochim. et biophys. acta.— 1964.—91, N 3.— P. 633—655.
7. Изучение кодового соответствия тРНК<sub>1-6</sub><sup>Лей</sup> молочной железы коров / Г. В. Овчаренко, А. П. Потапов, Б. С. Негруцкий и др. // Укр. биохим. журн.— 1983.—55, № 6.— С. 608—613.
8. Методы выделения тРНК и индивидуальных тРНК<sup>Лей</sup> и тРНК<sup>Фен</sup> из животных тканей / М. И. Коваленко, Н. И. Желтовская, А. В. Ельская, Г. В. Овчаренко // Методы соврем. биологии.— Киев: Наук. думка.— 1979.— С. 98—111.
9. Nirenberg M., Leder P. The effect of trinucleotides upon the binding of sRNA to ribosomes // Science.— 1964.—145, N 3639.— P. 1399—1407.
10. Wurmback P., Nierhaus K. H. Codon-anticodon interaction of the ribosomal P (peptidyl-tRNA) site // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1979.—76, N 5.— P. 2143—2147.
11. Peter M., Yarus M. Transfer RNA selection of the ribosomal A and P sites // J. Mol. Biol.— 1979.—134, N 3.— P. 471—491.

12. Ofengand J., Henes C. The function of pseudouridylic acid in transfer ribonucleic acid // J. Biol. Chem.—1969.—244, N 22.—P. 6241—6253.
13. The mechanism of codon-anticodon interactions in ribosomes. Heterogeneity of tRNA complexes with 70S ribosomes of *Escherichia coli* / S. V. Kirillov, V. I. Makchno, V. B. Odintsov, Yu. P. Semenov // Eur. J. Biochem.—1978.—89, N 1.—P. 305—313.

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

Получено 20.03.86

УДК 575.155:575.224.46

## ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПЛИКАЦИИ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНОМ SV40, В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

С. М. Ландау, Л. К. Сасина, Н. А. Чашин, Л. И. Чашина

В настоящее время широко применяют векторы для эукариотических клеток на основе ДНК вируса SV40. Основой для исследования функциональной активности таких векторов должно быть изучение их способности реплицироваться в перmissive системе клеток.

Однако в последнее время стало известно, что векторы на основе *pBR322* содержат «ядовитые» последовательности, препятствующие репликации рекомбинантных молекул в культурах клеток млекопитающих [1—3]. В связи с этим мы исследовали возможность индуцирования репликации рекомбинантных молекул, состоящих из плазмиды *pBR325* (производная *pBR322*) и полного генома SV40, в перmissive системе клеток CV1 с помощью обезьяньего вакуолизирующего вируса 40.

В перевиваемой системе клеток CV1 изучали репликацию бактериальных рекомбинантных плазмид, содержащих геном SV40. Исследовали следующие плазмиды: 1) *pYM*, созданную на основе *pBR322* и содержащую один полный геном SV40 [1] и 2) сконструированные нами на основе SV40 плазмиды *pSV2*, *pSV9*, содержащие один (*pSV2*) и два (*pSV9*) полных генома SV40 [4]. Все исследованные химерные плазмидные молекулы были получены с помощью рестриктазы *Bam*III, которая расщепляет молекулу ДНК SV40 в позднем районе, кодирующем капсидные белки вириона, и гидролизует плазмиды *pBR322* или *pBR325* в районе гена устойчивости к тетрациклину.

Для изучения репликации бактериальными плазмидами (0,5—0,6 мкг) обрабатывали культуры клеток млекопитающих во флаконах объемом 50 мл в присутствии кальций-фосфатного преципитата. Плазмидные ДНК из клеток млекопитающих выделяли в динамике инфекции [3]. Проводили дот-гибридизацию выделенных из культур клеток CV1 плазмидных ДНК с <sup>32</sup>P-SV40 (3·10<sup>7</sup> имп/мкг) или <sup>32</sup>P-*pBR322* (10<sup>8</sup> имп/мкг).

Еще до изучения репликации рекомбинантных бактериальных плазмид в клетках млекопитающих необходимо было выяснить динамику синтеза обезьяньего вакуолизирующего вируса SV40. Было показано, что при инфицировании обезьяньих клеток вирусной суспензией пик синтеза вирусной ДНК обнаруживается через одни или двое суток, что совпадает с данными литературы [5]. Позднее количество свободной вирусной ДНК уменьшается. Через 6—7 сут практически не удается обнаружить вирусной ДНК в эписомальном состоянии (рисунок, а).

Синтез ДНК плазмиды *pYM*, так же как и вирусной ДНК, возрастает через сутки (рисунок, б). Однако в отличие от ДНК вируса SV40 рекомбинантную плазмиду *pYM* удается выявить даже спустя 7 сут после трансфекции (рисунок, в), что свидетельствует о длительной самопроизвольной ее репликации в культурах клеток млекопитающих. Эти данные согласуются с данными литературы [3]. Расчет соотношения площадей пиков автордиограммы на рисунке, б, показал, что площадь пика нулевой точки инфекции относится к площадям пиков первых, вторых и третьих суток инфекции как 1 : 1; 4 : 1; 3 : 1,7 соответственно.