

10. Nirenberg M., Leder P. RNA codewords and protein synthesis. The effect of trinucleotides upon the binding of sRNA to ribosomes // Science.—1964.—145, N 3639.—P. 1399—1407.
11. Rheinberger H.-J., Sternbach H., Nierhaus K. H. Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1981.—78, N 9.—P. 5310—5314.
12. Kirillov S. V., Semenov Yu. P. Non-exclusion principle of AcPhe-tRNA interaction with the donor and acceptor sites of *Escherichia coli* ribosomes // FEBS Lett.—1982.—148, N 2.—P. 235—238.
13. Peters M., Yarus M. Transfer RNA selection at the ribosomal A and P sites // J. Mol. Biol.—1979.—134, N 3.—P. 471—491.
14. Non-acylated tRNA binding on rat liver 60S subunits / M. Buisson, A.-M. Reboud, S. Dubost, J. P. Reboud // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1979.—90, N 2.—P. 634—640.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ленингр. ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова, Гатчина

Получено 10.11.86

УДК 577.217.532+577.18.02

БЕСФАКТОРНЫЙ ПОЛИ(dT)-ЗАВИСИМЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОФЕНИЛАЛАНИНА НА 70S РИБОСОМАХ ESCHERICHIA COLI

К. А. Солдаткин, А. П. Потапов, А. В. Ельская

В рамках проверки гипотезы о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов, постулирующей прямое взаимодействие некоторого участка декодирующего центра рибосомы с сахаро-фосфатным остовом кодон-антикодонных дуплетов [1, 2], нами начато сравнительное изучение матричной активности поли(U) и ее дезоксирибоаналога, поли(dT), в трансляции. Один из этапов работы состоял в определении активности данных полинуклеотидов в бесфакторном кодонзависимом связывании Phe-tРНК^{Phe} на 70S рибосомах *E. coli* в отсутствие и присутствии антибиотика неомидина, способного, как известно [3, 4], стимулировать трансляцию полидезоксирибонуклеотидных матриц в бесклеточных белоксинтезирующих системах.

Материалы и методы. 30S и 50S субчастицы рибосом *E. coli* MRE 600 любезно предоставлены В. И. Махино (ЛИЯФ им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина). Поли(U) фирмы «Reanal» (ВНР), поли(dT) — НИКТИ БАН (Бердск), [¹⁴C]фенилаланин (13,3 ГБк/ммоль) производства ЧССР, неомидинсульфат фирмы «Boehringer» (ФРГ). Высокообогащенные (1400—1600 пмоль на 1 ед. А₂₆₀) [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} получали из дрожжей по [5]. Связывание [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} с 70S рибосомами проводили по [6] в присутствии 20 мМ трис-НСl, рН 7,6, 100 мМ NH₄Cl и 20 мМ MgCl₂. Разделение моно- и олигофенилаланинов проводили хроматографией на бумаге FN-15 в растворителе *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (78 : 5 : 17) [7].

Результаты и обсуждение. При изучении взаимодействия Phe-tРНК^{Phe} с поли(dT)-программированными 70S рибосомами в условиях бесфакторного связывания при 2°C был обнаружен аномально высокий уровень заполнения рибосом субстратом — количество остатков [¹⁴C]фенилаланина на рибосому равнялось четырём—пяти вместо обычных двух, соответствующих А- и Р-центрам. Из рис. 1 видно, что количество связанных с рибосомой остатков фенилаланина растёт во времени, причём при 37°C значительно быстрее, чем при 2°C. Но в присутствии антибиотика неомидина, а также на поли(U)-программированных рибосомах связывается не более двух молекул Phe-tРНК^{Phe}. Наблюдающееся при длительных инкубациях снижение уровня связывания Phe-tРНК^{Phe} с [поли(U)·70S] при 37°C, по-видимому, объясняется десорбцией тРНК с рибосом с последующим их деацилированием: в тех же условиях за 70 мин инкубации деацилировалось 65—70 % Phe-tРНК^{Phe} (данные не приведены). Комплексы с участием поли(dT) были стабильными.

Поскольку наиболее вероятной причиной аномального увеличения количества связанного с рибосомой в присутствии поли(dT) радиоактивного материала может быть трансляция, был проведен хроматографический анализ меченых продуктов после деацилирования тРНК (0,16 М КОН, 30 мин, 37°C) в условиях разделения моно-, ди- и трифенилаланина. Оказалось (рис. 2), что в системе, содержащей [поли(dT)·70S], обра-

зуются не только ди-, но и трифенилаланин. Кроме того, на старте хроматограммы оставалось большое количество радиоактивного материала, которое строго коррелировало с радиоактивностью ТХУ-нерастворимого (после деацелирования тРНК) материала. Следовательно, материал на старте хроматограммы соответствует олигофенилаланинам с количеством звеньев не менее четырех [8]. Таким образом, в данном случае имеет место трансляция поли(dT).

В присутствии 10 мкМ неомицина количество трифенилаланина увеличивалось, но значительно уменьшалось количество материала на старте. В пробах с 100 мкМ неоми-

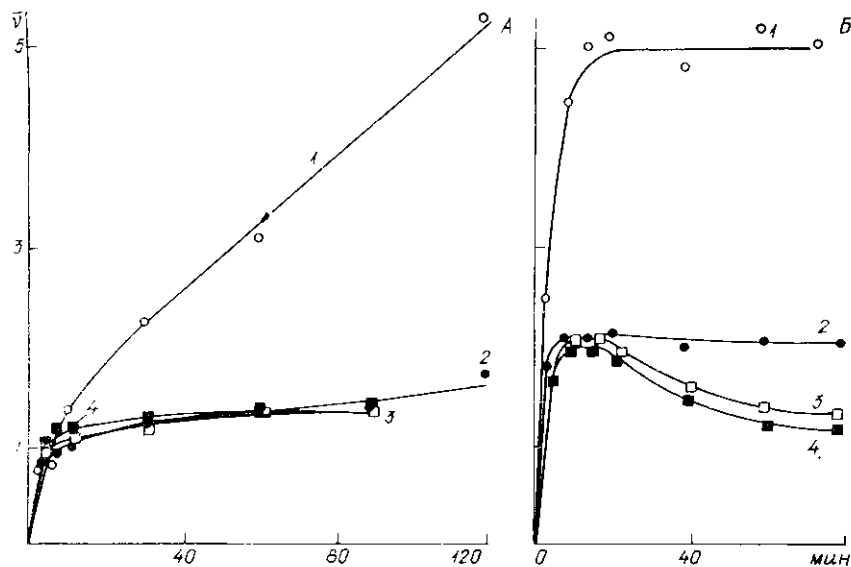


Рис. 1. Кинетика связывания $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ с $[\text{поли}(\text{dT})\cdot 70\text{S}]$ и $[\text{поли}(\text{U})\cdot 70\text{S}]$: А — инкубация при 2°C (пробы содержали: 1, 2—3 мкг поли(dT), 5,7 пмоль 30S субчастиц, 9 пмоль 50S субчастиц, 50 пмоль $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; 3, 4—5,6 пмоль 30S субчастиц, 9 пмоль 50S субчастиц, 5 мкг поли(U), 35 пмоль $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; 2, 4 — инкубацию проводили в присутствии 10 мкМ неомицина); Б — инкубация при 37°C (пробы содержали: 1, 2—2,5 мкг поли(dT), 6 пмоль 30S субчастиц, 9 пмоль 50S субчастиц, 44 пмоль $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; 3, 4—5 мкг поли(U), те же количества субчастиц и $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; 2, 4 — инкубацию проводили в присутствии 100 мкМ неомицина). \bar{v} — количество молекул $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$, связанных с одной рибосомой. Опыты, представленные на рис. 1, А и Б, выполнены на различных препаратах 30S субчастиц.

Fig. 1. Kinetics of $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ binding to $[\text{poly}(\text{dT})\cdot 70\text{S}]$ and $[\text{poly}(\text{U})\cdot 70\text{S}]$ complexes: А — incubation at 2°C (samples contained: 1, 2—3 μg of poly(dT), 5,7 pmol of 30S subunits, 9 pmol of 50S subunits, 50 pmol of $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; 3, 4—5 μg of poly(U), 5,6 pmol of 30S subunits, 9 pmol of 50S subunits, 35 pmol of $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$. 2, 4 — incubation in the presence of 10 μM neomycin); Б — incubation at 37°C (samples contained: 1, 2—2,5 μg of poly(dT), 6 pmol of 30S subunits, 9 pmol of 50S subunits, 44 pmol of $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; 3, 4—5 μg of poly(U) and the same concentrations of subunits and $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$; 2, 4 — incubation in the presence of 100 μM neomycin). \bar{v} — the actual fraction of ribosomes bound with $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ ($[\text{Phe-tRNA bound}]/[70\text{S ribosomes}]$). Data presented in Figs 1, А and Б were obtained on different preparations of 30S subunits.

цином, как и в пробах с поли(U), образовывался только дифенилаланин в количествах, соответствующих связанному с рибосомой $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$. Иными словами, полимеризации фенилаланина на поли(dT)-программированных рибосомах в присутствии 100 мкМ неомицина, а также на поли(U)-программированных рибосомах не происходит из-за отсутствия транслокации.

Обнаруженная нами бесфакторная трансляция поли(dT) рибосомами, не транслирующими поли(U) в отсутствие факторов элонгации ни при низкой, ни при высокой температурах, очевидно, означает, что структура сахаро-фосфатного остова матрицы существенна для преодоления активационного барьера бесфакторной транслокации. Возможно, важно наличие или отсутствие 2'-ОН-групп рибозы само по себе. Возможно, кодон-антикодонный комплекс, образующийся с участием поли(dT), легче транслируется в силу более приемлемой его конформации или меньшего сродства к А-центру рибосомы в отсутствие факторов.

Факт трансляции поли(dT) при низкой температуре (2°C) позволяет сделать вывод о том, что активационный барьер транслокации может быть не очень большим.

В работах по безматричному рибосомному синтезу пептидов [9] делается предположение о ведущей роли тРНК в процессе транслокации. Наши данные свидетельствуют

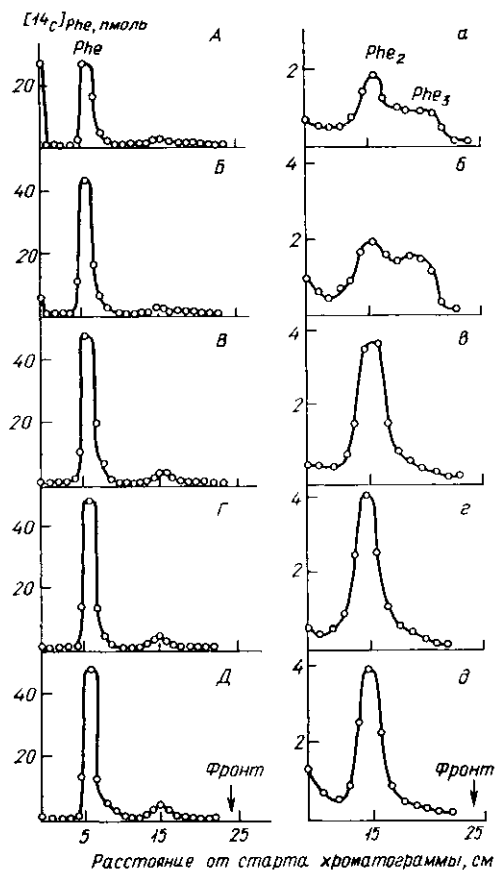


Рис. 2. Разделение олигофенилаланинов с помощью хроматографии на бумаге FN-15: А, а — поли(dT); Б, б — поли(dT)+10 мкМ неомицин; В, в — поли(dT)+100 мкМ неомицин; Г, г — поли(U); Д, д — поли(U)+100 мкМ неомицин. Инкубация 2 ч при 3°C. Пробы содержали: 3 мкг поли(dT) или 5 мкг поли(U); 8,7 пмоль 30S субчастиц, 13 пмоль 50S субчастиц, 98 пмоль $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$. Графики рис. 2, а—д соответствуют участкам 10—25 см рис. 2, А—Д в увеличенном масштабе

Fig. 2. Chromatographic analysis of the $[^{14}\text{C}]$ oligophenylalanines. Incubation for 2 h at 3°C. Samples contained: 3 μg of poly(dT) or 5 μg of poly(U); 8.7 pmol of 30S subunits, 13 pmol of 50S subunits, 98 pmol of $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$. Plots of Fig. 2, а—д correspond to 10-25 cm of Fig. 2, А—Д

ют о существенной роли матрицы в этом процессе. По крайней мере в случае Рне-тРНК^{Phe} оба компонента транслоцируемого комплекса — и матрица, и тРНК — важны для обеспечения нормальной транслокации.

Авторы благодарят В. И. Махно, С. В. Кириллова и А. П. Сургучева за содействие в выполнении данной работы.

FACTOR-FREE POLY(dT)-DEPENDENT SYNTHESIS OF OLIGOPHENYLALANINE ON *ESCHERICHIA COLI* 70S RIBOSOMES

K. A. Soldatkin, A. P. Potapov, A. V. Elskaya

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

Summary

The activity of poly(U) and poly(dT) in the factor-free binding of Phe-tRNA^{Phe} to the *E. coli* 70S ribosomes has been compared to study the role of the codon sugar-phosphate backbone in the mRNA decoding process. Poly(dT) is shown to be effectively translated in such a factor-free system at both low (2°C) and high (37°C) temperatures. Under the same conditions poly(U) is not translated. Neomycin inhibits factor-free poly(dT) translation and has no effect on the binding of Phe-tRNA^{Phe} to poly(U) programmed ribosomes. The data obtained indicate the great importance of the template and its sugar-phosphate backbone in the translocation process.

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA 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 // Biochemistry.—1965.—54, N 3.— P. 880—886.
4. Salas J., Bollum F. J. Biosynthetic polydeoxynucleotides as direct templates for polypeptide synthesis // J. Biol. Chem.—1968.—243, N 5.— P. 1012—1015.
5. Gillam I. C., Tener C. M. The use of BD-cellulose in separation of transfer RNA's // Meth. Enzymol.—1971.—20, pt C.— P. 55—70.
6. Nirenberg M., Leder P. RNA codewords and protein synthesis // Science.—1964.—145, N 3639.— P. 1399—1407.
7. Hamburger A. D., De Groot N., Lapidot Y. Peptidyl-tRNA. XI. The chemical synthesis of phenylalanine-containing oligopeptidyl-tRNA // Biochim. et biophys. acta.—1970.—213, N 1.— P. 115—123.
8. Гаврилова Л. П., Смолянинов В. В. Изучение механизма транслокации в рибосомах. 1. Синтез полифенилаланина в рибосомах *Escherichia coli* без участия гуанозин-5'-трифосфата и белковых факторов трансляции // Молекуляр. биология.—1971.—5, № 6.— С. 883—891.
9. Юсупова (Тналина) Г. Ж., Белицина Н. В., Спириин А. С. Рибосомный синтез пептидов из аминоксил-тРНК в отсутствие матричного полинуклеотида: синтез полифенилаланина из фенилаланил-тРНК^{Leu} // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 4.— С. 185—189.

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

Получено 11.12.86

УДК 577.963.3

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ИЗ 50S СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ *THERMUS THERMOPHILUS*. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ БЕЛКА TL7

С. Э. Седельникова

Введение. Изучение структуры рибосом и других компонентов белоксинтезирующей системы в последнее время выходит на уровень, связанный с возможностью применения рентгеноструктурного анализа. Лимитирующей стадией в таких исследованиях долгое время было получение кристаллов. Введение в лабораторную практику термофильных бактерий в качестве источника для получения компонентов белоксинтезирующей системы позволило приступить к решению этой проблемы. К настоящему времени получены кристаллы ряда рибосомных белков [1—3] и 50S субчастицы [4] из умеренно термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus*. Закристаллизованы 5S РНК [5], фактор элонгации полипептидной цепи G [6], 70S рибосома [7] из экстремально термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Данная работа посвящена выделению ряда индивидуальных белков из 50S субчастицы рибосом *T. thermophilus* и кристаллизации одного из них, TL7 (по номенклатуре рибосомных белков *T. thermophilus*, приведенной в работе [8]). Этот белок, по-видимому, является аналогом белка L6 из рибосом *Escherichia coli*.

Материалы и методы. Выращивание бактериальной массы и выделение рибосом проводили, как описано в работе [8]. Разделение рибосом на субчастицы также проводили, как в работе [8], с той разницей, что ионный состав градиента концентрации сахарозы при разделении был следующий: 0,01 М MgCl₂, 0,4 М NaCl, 0,001 М Na₂ЭДТА, 0,02 М трис-НСl, рН₂₀ ^{оc} 7,5. Рибосомные белки экстрагировали по [9] с модификациями. Процедура заключалась в следующем. К раствору 50S субчастиц с концентрацией 10 мг/мл, содержащему 0,02 М MgCl₂, 1 М NH₄Cl, 0,0005 М Na₂ЭДТА, 0,04 М трис-НСl, рН₂₀ ^{оc} 7,5 и нагретому до 60 °С, добавляли равный объем нагретого до 60 °С этанола. Смесь инкубировали 50 мин при 60—61 °С и умеренном перемешивании. Рибосомные частицы отделяли от экстрагированного белка центрифугированием при 35000 g, надосадочную жидкость собирали, а осадок, содержащий белокдефицитные частицы, растворяли в буфере, содержащем 2 М NH₄Cl, и повторяли обработку этанолом.

Хроматографическое разделение полученных белковых смесей проводили на СМ-сепарозе СL («Pharmacia», Швеция) без применения денатурирующих агентов в натрий-ацетатном буфере при рН 5,6 с градиентом концентрации NaCl от 0,04 до 0,7 М.