



Структура и функция биополимеров

УДК 577.217

ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕАЦИЛИРОВАННОЙ ИНИЦИАТОРНОЙ тРНК И АМИНОАЦИЛ-тРНК С Р- И А-САЙТАМИ 30S СУБЧАСТИЦ РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI* НА МАТРИЦЕ AUG(U)_n

Н. А. Гобштис, В. Б. Одинцов, С. В. Кириллов

Введение. Процесс биосинтеза белка у прокариот начинается с образования комплекса 30S субчастицы с участком мРНК, содержащим инициаторный кодон AUG (иногда GUG или UUG), и инициаторной тРНК (fMet-тРНК^{Met}) при участии иницирующих факторов и GTP [1, 2]. *In vitro* при повышенных концентрациях ионов магния образование инициаторного комплекса, достаточно стабильного, происходит без участия факторов и GTP [3]. В стабилизации инициаторного комплекса существенную роль может играть взаимодействие Шайн—Далгарно между комплементарными областями предынициаторного участка мРНК, богатого пуриновыми основаниями, и 3'-концевой частью 16S РНК [4]. Рассчитанная стандартная свободная энергия этого взаимодействия довольно значительна ($\Delta G^0 = -(10-15)$ ккал/моль [5]) и совпадает по величине с энергией взаимодействия полиуридилевой кислоты с 30S субчастицей — $\Delta G^0 = -(11-14)$ ккал/моль [6]. До сих пор является дискуссионным вопрос об участке связывания инициаторной тРНК на комплексе [30S+мРНК]: существует ли для этого специальный инициаторный (I) сайт, происходит ли связывание на пептидилном (P) сайте или же эти сайты в значительной мере перекрываются [7, 8].

В настоящей работе показано, что 30S субчастицы рибосом *E. coli*, запрограммированные матрицей AUG(U)_n, связывают две молекулы тРНК: тРНК^{Met} или fMet-тРНК^{Met} на Р-сайт и Phe-тРНК^{Phe} на А-сайт. Определены константы ассоциации тРНК^{Met} с Р-сайтом [30S+ AUG(U)_n]-комплекса и константы ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-сайтом [30S+ AUG(U)_n+ тРНК^{Met}]-комплекса при различных температурах и концентрациях ионов магния.

Материалы и методы. Субчастицы рибосом *E. coli*, суммарная равномерно меченная [¹⁴C]тРНК, Phe-тРНК^{Phe}, аминокислотированная [³H]фенилаланином (ВО «Изотоп», Ленингр. отд-ние, с удельной активностью 296 ГБк/ммоль) или [¹⁴C]фенилаланином («UVVVR», ЧССР, с удельной активностью 13,3 ГБк/ммоль) были получены, как в [9]. Обогащение в обоих случаях составило 1500 пмоль фенилаланина на 1 ед. A₂₆₀. Деацелированную инициаторную тРНК (равномерно меченную и немеченую) выделяли по [10]. Препарат немеченой тРНК аминокислотировали [³H]метионином (ВО «Изотоп», Ленингр. отд-ние, с удельной активностью 74 ГБк/ммоль) до 1600 пмоль метионина на 1 ед. A₂₆₀ и одновременно формилировали на 95% лейковарином («Serva», ФРГ), как в [10]. Тринуклеотид A_pU_pG_p выделен по методу [11]. Синтез олигонуклеотидов AUG(U)_n проводили при помощи полинуклеотидфосфорилазы из *Micrococcus lysodeikticus* («Calbiochem», США) с достраиванием 3'-конца UDP («Reanal», ВНР). Фракции

AUG(U)_n с Kd 0,4—0,6, где $n \leq 50$, были использованы в экспериментах по изучению взаимодействия с тРНК и 30S субчастицами. Константы ассоциации тРНК с 30S субчастицами измеряли с помощью модифицированного метода фильтрования Ниренберга и Ледера [9] и рассчитывали из изотермы адсорбции Ленгмюра: $1/v = 1/M + 1/MKc$, где v — количество молекул тРНК, связанных с каждой рибосомой (или субчастицей); M — доля активных сайтов; c — концентрация свободной тРНК; K — константа ассоциации. Анализ щелочного гидролизата для определения доли активных в синтезе дипептида (fMet-Phe) 70S рибосом осуществляли методом восходящей хроматографии на бумаге FN-1 («Filtrak», ГДР) в системе изопропанол : аммиак : вода в соотношении 7 : 1 : 2.

Все эксперименты проводили в буферных растворах ТАМ (20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 200 мМ NH₄Cl; 10—20 мМ MgCl₂ и 1 мМ ЭДТА). Концентрация ионов Mg²⁺, температура и время инкубации указаны в подписях к рисункам и в таблицах. Инкубационные смеси в объеме 50 мкл содержали: I — 4,8—5,2 пмоль 30S субчастиц, 1—2 мкг AUG(U)_n и от 40 до 500 пмоль [¹⁴C]тРНК_f^{Met} в зависимости от концентрации ионов Mg²⁺ и температуры; II — к смеси I были добавлены 3,9—50 пмоль [³H]Phe-тРНК^{Phe}.

Результаты и обсуждение. Взаимодействие комплекса [30S+AUG(U)_n] с тРНК_f^{Met}. Ранее нами была доказана обратимость реакции ассоциации тРНК_f^{Met} с 30S субчастицами и показано, что 20—30 мин достаточно для равновесного образования комплекса [30S+AUG(U)_n+тРНК_f^{Met}]. Это позволило количественно изучить тер-

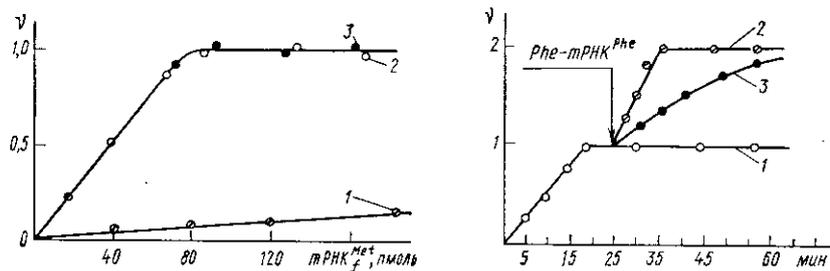


Рис. 1. Титрование комплекса [30S+AUG(U)_n] [¹⁴C]тРНК_f^{Met} в присутствии антибиотиков: 1 — связывание тРНК_f^{Met} в присутствии 5·10⁻⁶ М эдеина; 2, 3 — связывание тРНК_f^{Met} без тетрациклина и в его присутствии в концентрации 5·10⁻⁵ М соответственно. В опыте использована инкубационная смесь I. Эксперимент проводили при 12 °С и 20 мМ Mg²⁺

Fig. 1. Titration of the complex [30S+AUG(U)_n] with [¹⁴C] tRNA_f^{Met} in the presence of antibiotics: 1 — binding of tRNA_f^{Met} in the presence of 5·10⁻⁶ M of edeine; 2, 3 — binding of tRNA_f^{Met} without tetracycline and in its presence in the concentration of 5·10⁻⁵ M, respectively. Incubation mixture I was used in the experiment. The experiment was carried out at 12 °С and 20 mM of Mg²⁺

Рис. 2. Кинетика взаимодействия Phe-тРНК^{Phe} с А-сайтом комплекса [30S+AUG(U)_n+тРНК_f^{Met}] в присутствии тетрациклина: 1 — связывание тРНК_f^{Met}; 2 — связывание Phe-тРНК^{Phe} без тетрациклина; 3 — связывание Phe-тРНК^{Phe} в присутствии 5·10⁻⁵ М тетрациклина. После 25 мин инкубации при 15 °С и 20 мМ Mg²⁺ в инкубационную смесь I, содержащую 120 пмоль [¹⁴C]тРНК_f^{Met}, были добавлены 50 пмоль [³H]Phe-тРНК^{Phe} (инкубационная смесь II) с тетрациклином и без него, после чего инкубацию продолжали

Fig. 2. Kinetics of Phe-tRNA^{Phe} interaction with A-site of the complex [30S+AUG(U)_n+tRNA_f^{Met}] in the presence of tetracycline: 1 — binding of tRNA_f^{Met}; 2 — binding of Phe-tRNA^{Phe} without tetracycline; 3 — binding of Phe-tRNA^{Phe} in the presence of 5·10⁻⁵ M of tetracycline. After 25 min of incubation at 15 °С and 20 mM of Mg²⁺ 50 pmol of [³H] Phe-tRNA^{Phe} (incubation mixture II) with and without tetracycline were added into incubation mixture I containing 120 pmol of [¹⁴C]tRNA_f^{Met}, and then the incubation was continued

модинамику связывания тРНК_f^{Met} с комплексом [30S+AUG(U)_n]. На рис. 1 приведены кривые титрования 30S субчастиц, программированных матрицей AUG(U)_n с тРНК_f^{Met} в присутствии антибиотиков тетрациклина и эдеина. Связывание тРНК_f^{Met} происходит на Р-сайте, так как почти полностью тормозится эдеином, ингибитором связывания на Р-сайт [12], и не зависит от присутствия тетрациклина, кинетического

ингибитора А-сайта [13]. Константы ассоциации тРНК_i^{Met} на Р-сайт 30S субчастиц комплекса даны в табл. 1. Рассчитанные термодинамические параметры этого взаимодействия представлены в табл. 2. Константы ассоциации относительно невелики: находятся в пределах $7 \times 10^6 \div 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ при температурах 10—25 °С и концентрациях ионов Mg^{2+} 10—20 мМ (табл. 1), причем величина K_a при 10 мМ Mg^{2+} и 20 °С оказалась близкой к величине K_a тРНК_i^{Met} с комплексом [30S + AUG] при 8 мМ Mg^{2+} и 20 °С, полученной методом центрифугирования в равновесных условиях [14] (K_a соответственно равны $4 \cdot 10^5$ и $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$). Величины констант ассоциации тРНК^{Phe} на Р-сайт комплекса [30S + поли(U)] в 40—100 раз больше соответствующих констант ассоциации тРНК_i^{Met} на Р-сайт комплекса [30S + AUG(U)_n] ([15] и табл. 1). Сравнение констант ассоциации тРНК с комплексом 30S субчастиц на матрицах AUG и AUG(U)_n, лишенных всей предынициаторной области, и на матрице поли(U), вероятнее всего, свидетельствует не столько о важности длины матрицы с 3'-стороны от первого элонгаторного кодона, сколько о необходимости наличия последовательности оснований с 5'-стороны от инициаторного кодона [16].

Кинетика взаимодействия комплекса [30S + AUG(U)_n + тРНК_i^{Met}] с Phe-тРНК^{Phe} представлена на рис. 2. Сначала был образован вышеуказанный комплекс, затем в инкубационную смесь добавлена Phe-тРНК^{Phe} с тетрациклином и без него. Уровень связывания тРНК_i^{Met} равен приблизительно 1, за 10 мин уровень связывания Phe-тРНК^{Phe} также приближается к 1, в присутствии тетрациклина тот же уровень достигается за 30 мин. Таким образом, связывание Phe-тРНК^{Phe} происходит на А-сайте, для которого характерно кинетическое ингибирование связывания тетрациклином. При концентрации Mg^{2+} 10—20 мМ и температуре 14, 21 и 26,5 °С величины констант ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-сайтом комплекса [30S + AUG(U)_n + тРНК_i^{Met}] соответственно $12,0 \cdot 10^6$, $4,2 \cdot 10^6$ и $2,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (стандартная ошибка измерений K_a не превышала 10 %). Термодинамические параметры этого взаимодействия следующие: $\Delta G^0 = -9,0 \pm 0,2$ ккал/моль; $\Delta H^0 = -19,8$ ккал/моль; $\Delta S^0 = -36,2$ кал·моль⁻¹ × град⁻¹. Особенность связывания на А-сайт 30S субчастицы комплекса [30S + AUG(U)_n + тРНК_i^{Met}] — полная независимость величины констант ассоциации от концентрации ионов Mg^{2+} (10—20 мМ) в пределах данной температуры, что, вероятно, свидетельствует о неучастии ионов Mg^{2+} в данном взаимодействии.

Таблица 1

Величины констант ассоциации тРНК_i^{Met} с Р-сайтом комплекса [30S + AUG(U)_n] ($\cdot 10^6$)
Association constants of tRNA_i^{Met} for the P-site of complex [30S + AUG(U)_n] ($\cdot 10^6$)

Mg ²⁺ , мМ	Температура, °С			
	10	15	20	25
10	1,7	0,8	0,4	0,3
15	3,2	2,0	1,0	0,7
20	7,0	3,3	2,0	—

Примечание. Стандартная ошибка измерений K_a составляла около 10 %.

Таблица 2

Термодинамические параметры взаимодействия тРНК_i^{Met} с Р-сайтом комплекса [30S + AUG(U)_n]

Thermodynamical parameters of tRNA_i^{Met} binding at the P-site of complex [30S + AUG(U)_n]

Mg ²⁺ , мМ	ΔG^0 , ккал/моль				ΔH^0 , ккал/моль при 25°С	ΔS^0 , кал·моль ⁻¹ × град ⁻¹
	Температура, °С					
	10	15	20	25		
10	-8,1	-7,8	-7,5	-7,4	-26,5	-64,0
15	-8,4	-8,3	-8,0	-7,9	-23,2	-51,0
20	-8,9	-8,6	-8,3	—	-20,0	—

Дополнительным и прямым доказательством того, что Phe-tRNA^{Phe} связывается на А-сайт, является следующий эксперимент: вместо деацелированной инициаторной тРНК на Р-сайт 30S субчастицы комплекса [30S+AUG(U)_n] была связана формил[³H]метионил-tRNA^{Met} в количестве одной молекулы на каждую 30S субчастицу, затем была добавлена [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}, проведен контроль на образование комплекса [30S+AUG(U)_n+fMet-tRNA^{Met}+Phe-tRNA^{Phe}], после чего в инкубационную смесь внесли 50S субчастицы. По окончании инкубации был добавлен 25%-ный раствор аммиака, и далее щелочной гидролизат хроматографировали, как описано в методике. Анализ хроматограммы показал, что более 85 % 70S рибосом активны в синтезе дипептида f[³H]Met-[¹⁴C]Phe, состав которого количественно подтвержден по двойной радиоактивной метке. Дипептид имел подвижность R_f ~ 0,9, совпадающую с подвижностью свидетеля в вышеуказанной хроматографической системе.

Таким образом, мы показали, что на 30S субчастице имеются два сайта связывания тРНК, которые реализуются как функциональные Р- и А-сайты 70S рибосомы не только в поли(U)-зависимой системе [15], но и в исследованной системе с матрицей, несущей инициаторный кодон AUG.

THERMODYNAMICS OF INTERACTION OF DEACYLATED INITIATOR tRNA AND AMINOACYL-tRNA WITH P- AND A-SITES OF 30S SUBUNITS OF ESCHERICHIA COLI RIBOSOMES PROGRAMMED BY AUG(U)_n

N. A. Gobshtis, V. B. Odinzov, S. V. Kirillov

V. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Gatchina, Leningrad District

Summary

Small ribosomal subunit of *E. coli* ribosome programmed by AUG(U)_n is capable to bind two molecules of tRNA (tRNA^{Met} or fMet-tRNA^{Met} plus Phe-tRNA^{Phe}). tRNA^{Met} is bound to P-site of 30S subunit of the complex [30S+AUG(U)_n] (or to the site overlapped with P-site). Phe-tRNA^{Phe} is bound to A-site of 30S subunits of the complex [30S+AUG(U)_n+tRNA^{Met}] and its binding is inhibited by tetracycline. The association constants tRNA^{Met} with the complex [30S+AUG(U)_n] and Phe-tRNA^{Phe} with the complex [30S+AUG(U)_n+tRNA^{Met}] are measured at different temperatures and magnesium concentrations and thermodynamic parameters of these interactions are calculated. When fMet-tRNA^{Met} is bound instead of tRNA^{Met}, dipeptide (fMet-Phe) formation is observed after addition of 50S subunits. Thus, there are two tRNA binding sites on 30S subunits which are realized as functional P- and A-sites of 70S ribosome not only in the poly(U)-dependent system but in the studied system with matrix carrying an initiator codon AUG.

1. Adams J. M., Capocchi M. R. N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1966.— 55, N 1.— P. 147—155.
2. Bretscher M. S., Marcker K. A. Polypeptidyl-sRibonucleic acid and aminoacyl-sRibonucleic acid binding sites on ribosomes // Nature.— 1966.— 211, N 5047.— P. 380—384.
3. Lucas-Lenard J., Lipmann F. Initiation of polyphenylalanine synthesis by N-acetylphenylalanyl-sRNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1967.— 57, N 4.— P. 1050—1057.
4. Shine J., Dalgarno I. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes // Nature.— 1975.— 254, N 5495.— P. 34—38.
5. Stormo G. D., Schneider T. D., Gold L. M. Characterization of translational initiation sites in *E. coli* // Nucl. Acids Res.— 1982.— 10, N 9.— P. 2971—2996.
6. Comparative study of the interaction of polyuridylic acid with 30S subunits and 70S ribosomes of *Escherichia coli* // V. I. Katunin, Yu. P. Semenov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov // Ibid.— 1980.— 8, N 2.— P. 403—421.
7. Clark B. F. C. Structure of tRNA during protein biosynthesis // Ribosomes: structure, function and genetics / Eds G. Chambliss et al.— Baltimore: Univ. Park press, 1980.— P. 413—443.
8. Ofengand J. The topography of tRNA binding sites on the ribosomes // Ibid.— P. 497—529.
9. Семенов Ю. П., Макаров Е. М., Кириллов С. В. Количественное изучение взаимодействия деацелированной тРНК с Р-, А- и Е-сайтами 70S рибосом *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.— 1985.— 1, № 4.— С. 183—193.

10. Walker R. T., RajBhandary U. L. Studies on polynucleotides // J. Biol. Chem.— 1972.— 247, N 15.— P. 4879—4892.
11. Aoyagi S., Inoue Y. Oligonucleotide studies // Ibid.— 1968.— 243, N 3.— P. 514—520.
12. Szer W., Kurylo-Borowska Z. Effect of edeine on aminoacyl-tRNA binding to ribosomes and its relationship to ribosomal binding sites // Biochim. et biophys. acta. 1970.— 224, N 2.— P. 477—486.
13. Kinetic aspects of tetracycline action on the acceptor (A) site of *Escherichia coli* ribosomes / Yu. P. Semenkov, E. M. Makarov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov // FEBS Lett.— 1982.— 144, N 1.— P. 125—129.
14. Binding of tRNA in different functional states to *Escherichia coli* ribosomes as measured by velocity sedimentation / M. Schmitt, U. Neugebauer, C. Bergmann et al. // Eur. J. Biochem.— 1982.— 127, N 5.— P. 525—529.
15. Кириллов С. В. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах // Прогр. науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1983.— С. 5—98 (Биол. химия.— Т. 18).
16. Effect of bases contiguous to AUG on translation initiation / M. C. Ganoza, P. Sullivan, C. Cunningham et al. // J. Biol. Chem.— 1982.— 257, N 14.— P. 8228—8232.

Ленингр. ин-т ядер. физики
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 06.06.86

УДК 577.214.42

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ДНК-ПОДОБНЫМИ ДУПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ПОВТОРЫ. ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ

О. Н. Королева, В. Л. Друца, З. А. Шабарова

Введение. Ранее в качестве моделей для изучения взаимодействия РНК-полимеразы *E. coli* с прокариотическими промоторами нами были предложены синтетические двуспиральные полинуклеотиды* с повторяющимися фрагментами промоторов [1]. В частности, были изучены некоторые свойства полимеров, содержащих повторы «идеальной» последовательности Прибноу (полимер I', схема 1). Оказалось, что они образуют с РНК-полимеразой устойчивые к гепарину транскрипционно активные комплексы с периодом полураспада ~230 мин [2], а в составе специальной промотор-тестирующей плазмиды они способны проявлять промотороподобные свойства, т. е. инициировать транскрипцию *in vivo* [3].

В продолжение этих исследований нами были синтезированы двуспиральные полинуклеотиды II—VI (схема 1), отличающиеся от уже изученного нами полимера I' незначительными изменениями в структуре повторяющегося фрагмента при сохранении того же нуклеотидного состава (содержание АТ-пар 80 %) и периодичности (10 пар нуклеотидов). Кроме того, был получен полимер I, практически полностью (за исключением концевых участков) идентичный по структуре полимеру I'.

На схеме I $\left(\begin{array}{c} \text{ТАТААТГ} \\ \text{1 2 3 4 5 6 7} \end{array} \right)$ — «идеальная» последовательность Прибноу

в пределах повторяющихся элементов синтетических дуплексов выделены последовательности, наиболее близкие к «идеальной» последовательности Прибноу. Значком сверху отмечены отклонения от полной гомологии. В настоящей работе предстояло выяснить, каким образом такие различия в структуре влияют на способность указанных полиме-

* Префикс d (дезокси) в сокращенном написании поли- и олигодезоксирибонуклеотидов здесь и в дальнейшем опущен.