

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕАЦИЛИРОВАННОЙ тРНК С Р-, А- И Е-САЙТАМИ 70 S РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*

Ю. П. Семенков, Е. М. Макаров, С. В. Кириллов

Введение. Деацилированная тРНК, образующаяся на Р-сайте рибосом в результате транспептидации, является одной из трех функциональных форм тРНК, удаление которой в акте транслокации является одним из ключевых и в то же время малоизученных событий этого процесса. Ясно, что знание сродства деацилированной тРНК к активным сайтам рибосомы необходимо как для понимания энергетики транслокации, так и для изучения функций третьего, Е-сайта, недавно обнаруженного в рибосомах из прокариот и специфичного к деацилированной тРНК [1].

На основе качественных данных Шраером и Нолем [2] был предложен следующий порядок относительного сродства функциональных форм тРНК к рибосомным сайтам: в ряду деацилированная тРНК — пептидил-тРНК — аминоацил-тРНК сродство растет слева направо к А-сайту и уменьшается к Р-сайту. В соответствии же с транслокационной гипотезой Ледера [3] сродство деацилированной тРНК, в противоположность этому порядку, к Р-сайту должно быть ниже (как продукта Р-сайта пептидилтрансферазы), чем у пептидил-тРНК, являющейся субстратом Р-сайта пептидилтрансферазы.

Имеющиеся экспериментальные данные по этому вопросу также противоречивы, малочисленны и получены в разных экспериментальных системах и условиях (концентрации двух- и одновалентных катионов, температуры и т. д.). Так, данные Хольшуха и соавт. [4] о том, что сродство деацилированной тРНК ниже к Р-сайту, чем у аналога пептидил-тРНК — Ас-Phe-тРНК^{Phe} — находятся в соответствии с гипотезой Ледера. По данным же Питерс и Яруса [5] и Райнбергера и соавт. [6], наоборот, аналоги пептидил-тРНК имеют меньшее сродство к Р-сайту, чем деацилированная тРНК. Зависимости же сродства обсуждаемых форм тРНК от этих условий неизвестны, что еще больше затрудняет сравнение результатов разных исследователей (например, константы ассоциации деацилированной тРНК с Р-сайтом колеблются от 10^6 M^{-1} у Хольшуха и соавт. [4] до 10^9 M^{-1} — у Кантора и соавт. [7]).

В настоящей работе измерены константы ассоциации деацилированной тРНК^{Phe} с Р-, А- и Е-сайтами 70S рибосом, а также определены зависимости этих констант на Р-сайте от концентрации ионов Mg^{2+} и температуры; определено относительное сродство аминоацил-, пептидил- и деацилированной тРНК к Р-, А- и Е-сайтам; предлагается термодинамически обоснованная модель диссоциации деацилированной тРНК из рибосомы в процессе транслокации с использованием Е-сайта как выходного.

Материалы и методы. Активные 30S- и 50S-субчастицы, а также фракционированную поли(U) ($M_r = 30\,000$) получали, как в [8, 9]. Высокообогащенные препараты тРНК^{Phe} выделяли по следующей модифицированной процедуре. Тотальную тРНК, полученную по методу Зубея [10], пропускали через колонку с бензоилированной ДЭА-целлюлозой (БД-целлюлоза), используя последовательно два линейных градиента: NaCl (0,4—1,0 М) и этанола (0—50 %) (рис. 1, А). Эта предварительная стадия необходима, так как если не освободить тотальную тРНК от спиртовой фракции (рис. 1, А, пик II), она будет в дальнейшем неизбежно загрязнять Phe-тРНК^{Phe}, поскольку обе выходят из колонки при одних и тех же концентрациях спирта (рис. 1, А, Б). Фракции, вымытые солевым градиентом и содержащие всю тРНК^{Phe} [11], объединяли и заряжали [¹⁴C]фенилаланином (800 расп./мин·пмоль). Для зарядки использовали ферментную фракцию S-100, свободную от РНК и имеющую отношение $A_{280}/A_{260} = 1,5$ [12]. [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} снова наносили на колонку с БД-целлюлозой и промывали ее градиентами NaCl и спирта так же, как на рис. 1, А. Обогащенная [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} выхо-

дила в трех основных фракциях: I — с обогащением 1500 пмоль/ед. A_{260} , II и III — с обогащением 1100 пмоль/ед. A_{260} (рис. 1, Б, кривая 2). Последние фракции объединяли и наносили на колонку с сефарозой-4В, которую затем промывали обратным градиентом сульфата аммония в основном по методу Холмса и соавт. [13]. Эта последняя стадия позволяет значительно «дообогатить» [^{14}C]Phe-тРНК^{Phe} — фракции 18—21 (рис. 1, В) содержали аминоксил-тРНК с обогащением 1920 пмоль/ед. A_{260} . Деацилированную немеченую тРНК получали деацилированием этой [^{14}C]Phe-тРНК^{Phe} (60 мин при 37 °С в 0,5 М трис-НСl, рН 9,0). Ас-[^{14}C]Phe-тРНК^{Phe} получали из этого же пре-

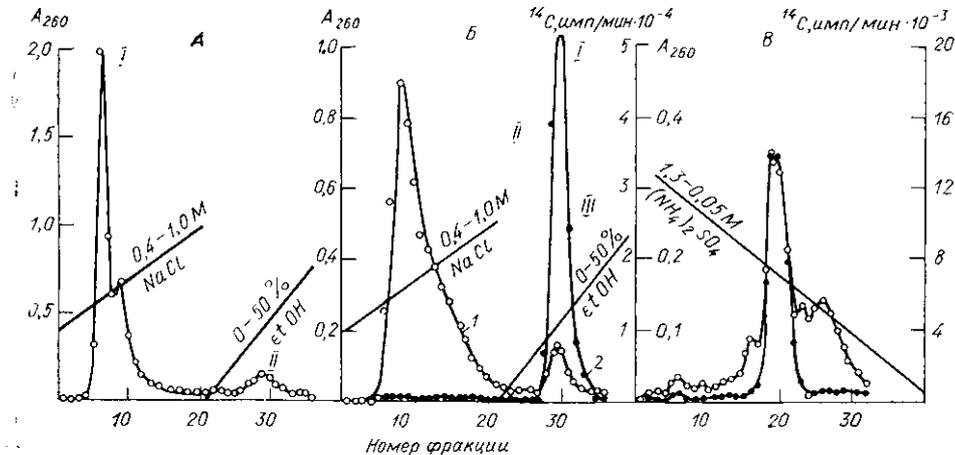


Рис. 1. Обогащение Phe-тРНК. А. 32000 ед. A_{260} тотальной тРНК нанесли на колонку с БД-целлюлозой (4,4×50 см) в буферном растворе А (0,05 М NaAc, рН 5,0, 0,01 М MgCl₂), содержащем NaCl в концентрации 0,4 М. Затем колонку элюировали последовательно четырьмя объемами линейного градиента концентрации NaCl 0,4—1,0 М в буферном растворе А (фракции 1—21) и тремя объемами линейного градиента этанола в концентрации 0—50 % (в буфере А, содержащем 1,0 М NaCl, фракции 21—35). Фракции 5—20 объединили для зарядки [^{14}C]фенилаланином. Б. Заряженные [^{14}C]фенилаланином фракции 5—20 (см. А) хроматографировали на БД-целлюлозе, как в А. В. 300 ед. A_{260} обогащенной [^{14}C]Phe-тРНК^{Phe} (~1100 пмоль/ед. A_{260} , из фракций II+III, В) перевели в 6 мл буферного раствора Б (0,01 М NaAc, рН 4,5, 10 мМ MgCl₂, 0,01 М ЭДТА, 6 мМ 2-меркаптоэтанол), содержащего 1,3 М (NH₄)₂SO₄, и нанесли на колонку с сефарозой-4В (1,1×27 см), уравновешенную в этих же условиях. Колонку элюировали шестью объемами обратного линейного градиента сульфата аммония в концентрации 1,3—0,05 М в буфере Б. Все процедуры проводили при 4 °С. I — A_{260} ; 2 — [^{14}C]радиоактивность.

Fig. 1. Enrichment of Phe-tRNA

парата аминоксил-тРНК по методу Липидота и Раппапорта [14]. Равномерно меченую [^{14}C]-урацилом деацилированную [^{14}C]тРНК^{Phe} выделяли из клеток *E. coli* AT2473, дефектных по синтезу урацила, как описано в [15]. Ее обогащали до 1270 пмоль/ед. A_{260} так же, как и немеченую тРНК^{Phe} (см. выше) с промежуточным деацилированием [^3H]фенилаланином; была опущена только последняя ступень очистки на сефарозе-4В.

Все эксперименты (исключая показанные на рис. 4 и 5) были выполнены в буферном растворе ТАМ (0,02 М трис-НСl, рН 7,4, 0,015 М MgCl₂, 0,2 М NH₄Cl, 0,001 М ЭДТА) при 25 °С. Измерение констант ассоциации тРНК с рибосомами проводили с помощью метода фильтрования Ниренберга и Ледера [38], модифицированного для равновесных измерений, как описано в [20]. Остальные условия экспериментов даны в подписях к рисункам. БД-целлюлозу синтезировали, как описано в [16]. В работе использовали сефарозу-4В фирмы «Pharmacia» (Швеция), тетрациклин и пурамицин — фирмы «Serva» (ФРГ) и эдеин — фирмы «Calbiochem» (США).

K^A , K^P и K^E — константы ассоциации тРНК с А-, Р- и Е-сайтами соответственно. Нижние индексы, использованные в тексте, обозначают: t — деацилированную тРНК^{Phe}, p — пептидил-тРНК (т. е. Ас-Phe-тРНК^{Phe}) и a — аминоксил-тРНК (т. е. Phe-тРНК^{Phe}).

Результаты и обсуждение. Отсутствие кодон-антикодонного взаимодействия для тРНК^{Phe} на Е-сайте. Ранее мы показали, что при высокой концентрации Mg²⁺ (20 мМ)

и 0 °С 70S рибосомы связывают три молекулы деацелированной тРНК^{Phe} в присутствии поли(У) (с Р-, А- и Е-сайтами) и две молекулы без поли(У) (с Р- и Е-сайтами) [17]. Взаимодействие тРНК^{Phe} с Е-сайтом оказалось практически кодоннезависимым, так как величины K_i^E равны $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (+поли(У)) и $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (—поли(У)). Аналогичную ситуацию мы наблюдаем и при понижении концентрации Mg^{2+} до 15 мМ и повышении температуры до 25 или 37 °С (рис. 1, А, Б), т. е. и в так называемых «физиологических» условиях, как это опре-

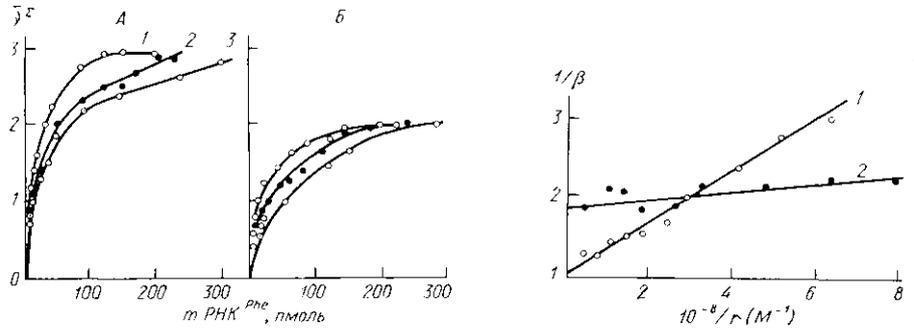


Рис. 2. Титрование 70S рибосом деацелированной тРНК^{Phe} в присутствии (А) и в отсутствие (Б) поли(У) при различных внешних условиях: 1 — 20 мМ Mg^{2+} , 0 °С [17]; 2 — 15 мМ Mg^{2+} , 25 °С; 3 — 15 мМ Mg^{2+} , 37 °С. Инкубационные смеси содержали в 100 мкл буферного раствора ТАМ: 10 пмоль 30S субчастиц, 11 пмоль 50S субчастиц, 10 мкг поли(У) и указанные количества [¹⁴С]тРНК^{Phe}. Время инкубации 3 ч.

Fig. 2. Titration of 70S ribosomes with deacylated tRNA^{Phe} in the presence (A) and absence (B) of poly(U) under different environmental conditions.

Рис. 3. Зависимость $1/\beta$ от $1/r$ для Ac-Phe-тРНК^{Phe} (1) и тРНК^{Phe} (2). Инкубационные смеси содержали в 0,2—5,0 мл буферного раствора ТАМ: 10 пмоль 30S субчастиц, 11 пмоль 50S субчастиц, 10 мкг поли(У) и 8,2 пмоль [¹⁴С]тРНК^{Phe} или 6,3 пмоль Ac-[¹⁴С]Phe-тРНК^{Phe}. Время инкубации 3 ч.

Fig. 3. The plots of $1/\beta$ vs. $1/r$ for Ac-Phe-tRNA^{Phe} (1) and tRNA^{Phe} (2).

делено Райнбергером и соавт. [18], Е-сайт реализуется количественно без участия соответствующего кодона. Этот результат противоречит данным вышеупомянутых авторов [18].

Взаимодействие деацелированной тРНК^{Phe} с Р-сайтом при вакантных А- и Е-сайтах. Из трех сайтов, Р, А и Е, тРНК^{Phe} имеет наибольшее сродство к Р-сайту. Это следует, в частности, из того, что наблюдается количественная корреляция между добавлением небольшого количества (30 %) тРНК^{Phe} и уменьшением связывания Ac-Phe-тРНК^{Phe} с пуромидинчувствительным, т. е. Р-сайтом [19]. Следовательно, измерение термодинамических параметров взаимодействия тРНК^{Phe} с Р-сайтом необходимо проводить при избытке рибосом над тРНК.

Измерения проводили методом переменного объема, когда во всех пробах содержатся одинаковые количества компонентов, причем отношение $70S/\text{тРНК} > 1$, концентрация поли(У) поддерживается насыщающей, а изменение концентраций компонентов достигается изменением объема смесей. Этот способ дает возможность даже при больших величинах K^P иметь надежно измеримые концентрации тРНК в растворе и, кроме того, определять долю активной тРНК. Изотерма адсорбции описывается в этом случае уравнением $1/\beta = 1/\gamma + 1/\gamma K^P r$, где β — доля связанной тРНК, γ — ее активная доля и r — концентрация свободных рибосом [20]. Поправку на долю активных рибосом мы здесь не вводим, так как все они активны в связывании тРНК (рис. 2). На рис. 3 показаны результаты опытов, сделанных с тРНК^{Phe} и Ac-Phe-тРНК^{Phe} в идентичных условиях. По наклону полученных прямых определяем константы ассоциации на Р-сайте: $K_i^P = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ для деацелированной тРНК^{Phe} и $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ для Ac-Phe-тРНК^{Phe} (K_D^P), т. е. сродст-

во тРНК^{Phe} к Р-сайту в четыре раза выше, чем у аналога пептидил-тРНК. По пересечению с осью ординат определяем и доли активных тРНК: $\gamma^P \simeq 90\%$ для Ас-Phe-тРНК^{Phe} и $\gamma^t \simeq 55\%$ для тРНК^{Phe}. Нужно отметить, что при использовании равномерно меченных урацилом препаратов тРНК, полученных при выращивании дефектных по синтезу урацила штаммов на минеральных средах, доля активной тРНК редко превышает 60%. Вероятно, это связано с частичной немодификацией минорных оснований в тРНК [21], важных для взаимодействия тРНК с рибосомой.

Из этого опыта ясно, что определение констант ассоциации по многим точкам с учетом величин γ обязательны. Если бы мы определяли

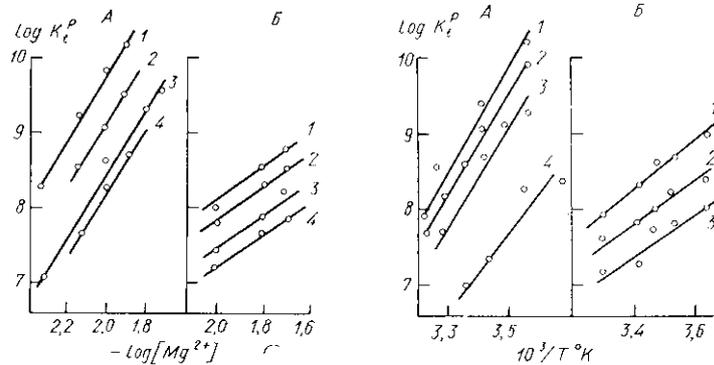


Рис. 4. Зависимости $\log K_t^P$ от $\log [Mg^{2+}]$. А — в присутствии поли(У) при 10 (1); 20 (2); 25 (3); 30 °С (4). Б — в отсутствие поли(У) при: 0 (1); 10 (2); 20 (3); 30 °С (4).

Fig. 4. The plots of $\log K_t^P$ vs. $\log [Mg^{2+}]$ at different temperatures in the presence (A) and absence (B) of poly(U).

Рис. 5. Зависимости Вант-Гоффа для деацелированной тРНК^{Phe} на Р-сайте. А — в присутствии поли(У) при концентрациях Mg^{2+} : 12,5 (1); 10 (2); 7,5 (3); 5 мМ (4). Б — в отсутствие поли(У) при 20 (1); 15 (2) и 10 мМ Mg^{2+} (3).

Fig. 5. Van't Hoff plots for the binding of deacylated tRNA^{Phe} at the P-site at different $[Mg^{2+}]$ concentrations in the presence (A) and absence (B) of poly(U).

величины K^P по одной точке, предполагая $\gamma^t = \gamma^P = 100\%$, что обычно и делается, то при больших концентрациях компонентов получили бы $K_t^P/K_p^P < 1$, а при малых концентрациях (большие объемы смесей) — противоположный результат.

В табл. 1 приведены результаты измерения величин K_t^P для деацелированной тРНК^{Phe} способом, описанным выше, при различных концентрациях Mg^{2+} и температурах, в присутствии и отсутствие поли(У). Графики рис. 4 показывают зависимости величин K_t^P от концентрации Mg^{2+} . В логарифмических координатах они линейны и подчиняются закону $\Delta \log K_t^P = n \Delta \log [Mg^{2+}]$. При условиях, что сайты связывания ионов магния идентичны и взаимонезависимы на взаимодействующих макромолекулах и компоненты комплекса связывают одно и то же число ионов магния как в растворе, так и в составе комплекса, величина n может быть интерпретирована как количество ионов Mg^{2+} , принимающих участие во взаимодействии этих макромолекул [22]. Легко подсчитать, что $n = 4,4 \pm 0,3$ в присутствии поли(У) и $n = 2,7 \pm 0,3$ — без поли(У), причем эти величины не зависят от температуры. Зависимости Вант-Гоффа, построенные по данным табл. 1, также линейны (рис. 5, А, Б), что позволяет подсчитать величины ΔH^0 , ΔG^0 и ΔS^0 взаимодействия деацелированной тРНК^{Phe} с Р-сайтом 70S рибосом (табл. 2).

Измерение константы ассоциации деацелированной тРНК^{Phe} с А-сайтом при занятых Р- и Е-сайтах. Определение величин K_t^A затруднительно из суммарной кривой на рис. 2, А, так как три сайта вовлечены в связывание тРНК^{Phe}, и А-сайт по термодинамическим причинам заполняется последним [6,

17]. Поэтому в данной работе для измерения K_i^A мы выбрали способ конкуренции немеченой тРНК^{Phe} с меченой Ас-[¹⁴С]Phe-тРНК^{Phe}. Мы показали ранее, что этим аналогом пептидил-тРНК можно одновременно заполнить Р- и А-сайты 70S рибосом, и параметры этого связывания хорошо известны [19]. При малых концентрациях тРНК^{Phe} конкурирует с Ас-Phe-тРНК^{Phe} исключительно за Р-сайт [19, 23, 24] и только при достаточно больших — за А-сайт также [24]. Опыт ставили следующим образом: к 10 пмоль комплекса 70S поли(U) добавляли смесь тРНК^{Phe} и Ас-[¹⁴С]Phe-тРНК^{Phe}. Пептидил-тРНК использовали в таких количествах (40 пмоль), чтобы в отсутствие тРНК^{Phe} величина $\bar{v}_p^{\Sigma} \rightarrow 2$, т. е. выполнялись условия $K_p^P [p] \gg 1$ и $K_p^A [p] \gg 1$; количество тРНК^{Phe} варьировали от 0 до 800 пмоль. В этих условиях количество молекул Ас-Phe-тРНК^{Phe}, связанных с одной рибосомой (\bar{v}_p^{Σ}), зависит от концентрации свободной тРНК^{Phe} следующим образом:

$$\bar{v}_p^{\Sigma} = \bar{v}_p^P + \bar{v}_p^A = \frac{K_p^P [p]}{1 + K_p^P [p] + K_i^P [t]} + \frac{K_p^A [p]}{1 + K_p^A [p] + K_i^A [t]}, \quad (1)$$

где $[p]$ и $[t]$ — концентрации свободных пептидил-тРНК и тРНК^{Phe}. Если мы обозначим $K_i^P/K_p^P = x$, $K_i^A/K_p^A = y$ и $[t]/[p] = z$, то нетрудно показать,

Таблица 1

Константы ассоциации деацелированной тРНК^{Phe} с Р-сайтом 70S рибосом при различных концентрациях Mg²⁺ и температурах (NH₄⁺ = 200 мМ)

Association Constants of Deacylated tRNA^{Phe} for the P Site of 70S Ribosomes at Different Concentrations of Mg²⁺ and Temperatures (NH₄⁺ = 200 мМ)

+поли (U)			-поли (U)		
Mg ²⁺ , мМ	T °C	K ^P · 10 ⁻⁸ , M ⁻¹	Mg ²⁺ , мМ	T °C	K ^P · 10 ⁻⁸ , M ⁻¹
5	0	3,22±0,85	10	0	0,95±0,20
5	10	2,02±0,48	10	10	0,58±0,13
5	17,5	0,23±0,05	10	15	0,49±0,07
5	25	0,10±0,01	10	20	0,23±0,01
7,5	10,5	21,5±3,5	10	30	0,17±0,04
7,5	13,5	15,0±5,3	15	0	2,62±0,32
7,5	20	3,71±0,27	15	10	1,69±0,27
7,5	30	0,52±0,05	15	15	1,05±0,19
10	11	58,0±8,5	15	20	0,61±0,06
10	20	14,1±4,9	15	30	0,43±0,12
10	30	2,02±0,24	20	0	6,98±0,59
10	25	4,37±0,32	20	10	3,45±0,50
12,5	11	125±85	20	15	3,02±0,58
12,5	20	30,8±2,1	20	20	1,95±0,61
12,5	30	5,02±0,39	20	30	0,86±0,09
12,5	37	1,2±0,4	—	—	—
15	25	22,3±5,4	—	—	—
20	25	37,2±8,3	—	—	—

Таблица 2

Термодинамические параметры взаимодействия деацелированной тРНК^{Phe} с Р-сайтом 70S рибосом

Thermodynamical Quantities of tRNA^{Phe} Binding at the P Site of 70S Ribosomes

поли (U)	ΔG°, кДж/моль	ΔH°, кДж/моль	ΔS°, Дж/моль·град.
+	—(53,1±4,2)	—(139,7±16,3)	—(285,1±20,9)
—	—(43,3±3,8)	—(44,4±4,2)	—(2,6±1,4)

Примечание. ΔG° и ΔS° измерены при 15 мМ Mg²⁺ и 25 °C.

что выражение (1) преобразуется в

$$1/\bar{v}_p^{\Sigma} = 1 + \frac{(1 + K_p^P xz [p])(1 + K_p^A yz [p]) - K_p^P K_p^A [p]^2}{K_p^P [p] (1 + K_p^A [p] + K_p^A yz [p]) + K_p^A [p] (1 + K_p^P [p] + K_p^P xz [p])} \quad (2)$$

При $z \rightarrow \infty$ (большие избытки тРНК^{Phe}) выражение (2) упрощается до

$$1/\bar{v}_p^{\Sigma} \rightarrow 1 + \frac{xy}{x + y} z, \quad (3)$$

что является уравнением прямой — касательной к дальней области кривой (2) и пересекающейся с осью ординат при значении $1/\bar{v}_p^{\Sigma} = 1$; ее наклон ра-

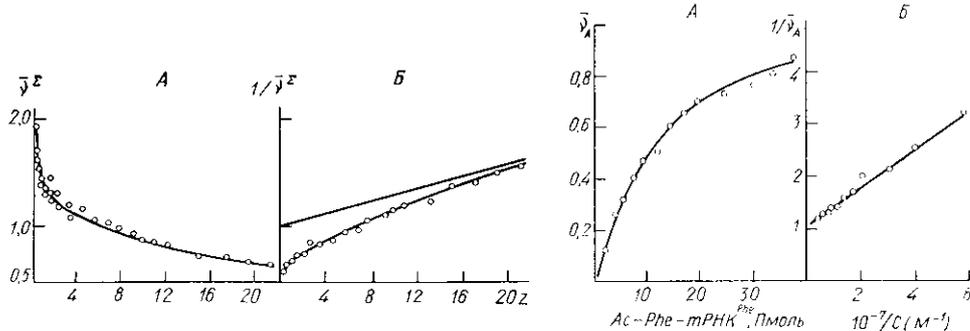


Рис. 6. Ингибирование связывания Ac-Phe-тРНК^{Phe} деацилированной тРНК^{Phe} (А) и то же в виде зависимости $1/\bar{v}_p^{\Sigma}$ от z (Б). Инкубационные смеси содержали в 150 мкл буферного раствора ТАМ: 7,4 пмоль 30S субчастиц, 8,0 пмоль 50S субчастиц, 10 мкг поли(У), 40 пмоль Ac-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} и 0—880 пмоль немеченой деацилированной тРНК^{Phe}. Время инкубации 3 ч.

Fig. 6. Inhibition of the Ac-Phe-tRNA^{Phe} binding at the P-and A-sites of the 70S poly(U) complex with deacylated tRNA^{Phe}.

Рис. 7. Титрование А-сайтов 70S поли(У) комплексов с Р-сайтами, предварительно занятыми деацилированной тРНК^{Phe} (А) и то же в двойных обратных координатах (Б). Смеси содержали в 50 мкл буферного раствора ТАМ: 10 пмоль 30S субчастиц, 11 пмоль 50S субчастиц, 5 мкг поли(У) и 30 пмоль деацилированной тРНК^{Phe}. После 60 мин инкубации к смесям добавляли 0—38 пмоль Ac-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} в 100 мкл буферного раствора ТАМ и инкубацию продолжали еще 90 мин.

Fig. 7. Titration of the A-sites of the 70S·poly(U) complexes with Ac-Phe-tRNA^{Phe} when the P-sites are preoccupied with tRNA^{Phe}.

вен $\frac{xy}{x + y}$. На рис. 6 показан результат такого эксперимента в прямых (А) и обратных (Б) координатах. Касательная, обозначенная на рис. 6, Б сплошной линией, имеет наклон $\frac{xy}{x + y} = 1/30$. Зная величину $x = 4$ из данных рис. 3, мы определяем и величину $y = K_t^A/K_p^A = 1/30$, т. е. константа ассоциации деацилированной тРНК^{Phe} с А-сайтом, K_t^A , приблизительно в 30 раз меньше, чем у Ac-Phe-тРНК^{Phe} (K_p^A).

Итак, при 15 мМ Mg²⁺, 200 мМ NH₄⁺ и 25° С $K_p^P = 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, $K_p^A = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [19], $K_t^P = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ и $K_t^A = 6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Термодинамическое обоснование образования модельных пре- и посттранслокационных комплексов. В 1972 г. Ватанабе показал, что добавление деацилированной тРНК вызывает «сдвиг» связывания Ac-Phe-тРНК (при избытке 70S рибосом) из Р- в А-сайт [23]. С тех пор это явление неизменно используют для изучения процесса транслокации в рибосомах и отмечают высокую специфичность образования посттранслокационного (—тРНК^{Phe}) и претранслокационного (+тРНК^{Phe}) комплексов [24]. Эта специфичность легко может быть объяснена с использованием величин констант ассоциации, измеренных выше. Если 10 пмоль комплек-

са 70S поли(U) в объеме 150 мкл преинкубировать с 3—1,5-кратным избытком деацилированной тРНК^{Phe}, то на основании приведенных выше данных нетрудно подсчитать, что будут заняты 99,5 (98) % Р-сайтов и только 4,5 (8) % А-сайтов. И действительно, если такой преформированный комплекс титровать Ас-Phe-тРНК^{Phe}, то практически одна молекула пептидил-тРНК связывается с рибосомой, причем в А-сайт, что подтверждает отсутствие реакции с пурамицином (рис. 7, А). Построив полученную зависимость в обратных координатах (рис. 7, Б), мы определяем в этом случае величину $K_p^A = 2,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, очень близкую к той, которая была измерена, когда оба сайта были доступны для пептидил-тРНК ($2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ [19]).

В случае, когда при образовании претранслокационного комплекса необходимо связать всю данную пептидил-тРНК с А-сайтом, т. е. когда

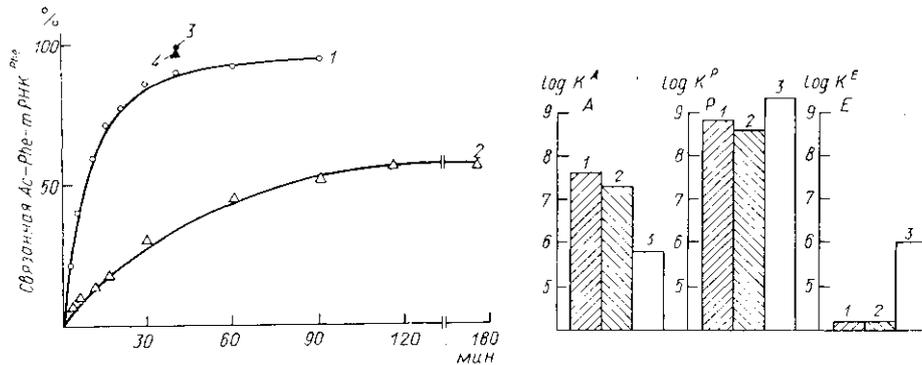


Рис. 8. Кинетика связывания Ас-Phe-тРНК^{Phe} с А-сайтом комплекса 70S поли(U). Инкубационные смеси содержали 25 пмоль 30S субчастиц, 30 пмоль 50S субчастиц, 10 мкг поли(U) и 60 пмоль тРНК^{Phe}. После 60 мин преинкубации к ним добавляли по 10,9 пмоль Ас-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} и измеряли кинетику ее связывания при конечных объемах смесей 50 (1) и 400 мкл (2). В контрольных смесях, не содержащих деацилированную тРНК^{Phe}, связывание Ас-[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} с Р-сайтом определяли после 30 мин инкубации при объемах смесей 50 (3) и 400 мкл (4).

Fig. 8. Kinetics of Ac-Phe-tRNA^{Phe} binding at the A-site of the 70S·poly(U) complex.

Рис. 9. Относительное сродство Phe-тРНК^{Phe} (1), N-ацетил-Phe-тРНК^{Phe} (2) и деацилированной тРНК^{Phe} (3) к А-, Р-, Е-сайтам комплекса [70S+поли(U)]. Константы ассоциации K^A , K^P , K^E различных функциональных форм тРНК с А-, Р-, Е-сайтами рибосом соответственно измерены при 15 мМ Mg²⁺ и 25 °С. Оценки величины K_p^E и K_a^E взяты из [15].

Fig. 9. Relative affinity of Phe-tRNA^{Phe} (1), Ac-Phe-tRNA^{Phe} (2) and tRNA^{Phe} (3) for the A-, P- and E-sites of the 70S·poly(U) complex. The upper limits for the K_p^E and K_a^E values are taken from [15].

присутствие ее в растворе нежелательно, нужно, очевидно, работать при избытке рибосом над Ас-Phe-тРНК^{Phe}. Если мы возьмем фиксированное количество активной Ас-Phe-тРНК^{Phe}, то, принимая во внимание, что $K_p^A = [A_p]/[A]$ [p], где $[A_p]$ и $[A]$ — концентрации занятых и свободных А-сайтов, условие ее полного связывания будет выглядеть как $[A_p]/[p] \gg 1$ или $K_p^A [A] \gg 1$. Отсюда рассчитываем, что, например, для 10 пмоль Ас-Phe-тРНК^{Phe} при объеме смеси 50 мкл необходимо взять не менее 25 пмоль рибосом. На рис. 8, 1 показано, что в этих условиях действительно ≈ 95 % Ас-Phe-тРНК^{Phe} связано. Если же условие $K_p^A [A] \gg 1$ не соблюдается и это соотношение равно, например, единице, что соответствует объему смеси 400 мкл, то в равновесии должно связаться только ≈ 50 % Ас-Phe-тРНК^{Phe}. Как видно из рис. 8, 2, наблюдается хорошее совпадение эксперимента с расчетом. В отсутствие тРНК^{Phe}, т. е. когда Р-сайт свободен, при объемах и 50, и 400 мкл вся Ас-Phe-тРНК^{Phe} связывается с Р-сайтами рибосом (рис. 8, 3, 4) вследствие достаточно высокого значения величины K_p^P ($5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, рис. 3 и [19]). Причиной образования только посттранслока-

ционных комплексов в этом случае является тот факт, что отношение K_p^P/K_p^A в условиях данного эксперимента равно 25 [19].

Количество ионов магния, принимающих участие при взаимодействии тРНК с рибосомой; физиологические и «нефизиологические» концентрации ионов магния. Как показано в настоящей работе, зависимость величины константы ассоциации деацилированной тРНК^{Phe} с Р-сайтом 70S рибосом от концентрации Mg^{2+} имеет вид $\Delta \log K_i^P = n \Delta \log [Mg^{2+}]$. Линейность этой зависимости позволяет, во-первых, оценивать величины K^P при тех концентрациях Mg^{2+} , где прямые измерения невозможны из-за слишком слабого или сильного взаимодействия тРНК с рибосомой и, во-вторых, определять количество ионов магния, принимающих участие в этом взаимодействии. Аналогичные результаты были получены нами ранее для Phe-тРНК^{Phe} и Ac-Phe-тРНК^{Phe} [12, 19, 25]. Различие заключается только в величинах n для всех трех форм тРНК, как это видно из табл. 3.

Таблица 3

Количество ионов магния, принимающих участие во взаимодействии Phe-тРНК^{Phe}, ацетил-Phe-тРНК^{Phe}, тРНК^{Phe} с Р- и А-сайтами 70S рибосом

The Numbers of Mg^{2+} Ions Involved in the Interactions of Phe-tRNA^{Phe}, Ac-Phe-tRNA^{Phe} and tRNA^{Phe} with the P and A Sites of 70S Ribosomes

Сайт	поли (U)	Phe-тРНК ^{Phe}	Ac-Phe-тРНК ^{Phe}	тРНК ^{Phe}
Р	+	5,6±0,4	5,8±0,4	4,4±0,3
Р	—	6,4±0,9	8,7±1,1	2,7±0,3
А	+	1,2±0,1	5,4±0,4	?
А	—	—	—	—

Далее анализ стехиометрии насыщающего связывания различных форм тРНК с рибосомами дает следующие результаты: $v_{\max}^2 = 2$ для Phe-тРНК^{Phe} и 30S субчастиц при 5, 10 и 20 мМ Mg^{2+} [8]; $v_{\max}^2 = 2$ для Phe-тРНК^{Phe} и 70S рибосом при 5, 10 и 20 мМ Mg^{2+} [26, 27]; $v_{\max}^2 = 2$ для Ac-Phe-тРНК^{Phe} и 70S рибосом в пределах концентрации Mg^{2+} , по крайней мере, 10—20 мМ [19]; $v_{\max}^2 = 3$ для деацилированной тРНК^{Phe} и 70S рибосом при 10 мМ [6], 15 мМ (рис. 2, А и [6]) и 20 мМ Mg^{2+} [17]. Сопоставляя эти данные с отсутствием каких-либо особенностей в зависимостях между $\Delta \log K$ и $\Delta \log [Mg^{2+}]$, о чем говорилось выше, приходим к следующим выводам: в модельных системах, где изучается взаимодействие тРНК с рибосомами в отсутствие факторов элонгации, нет объективных причин делить концентрации Mg^{2+} на физиологические и «нефизиологические». Концентрация ионов магния имеет только количественное значение, т. е. с ее вариациями в пределах, обычно используемых в экспериментах, меняются (и в сильной степени) константы ассоциации любой из трех биологических форм тРНК с рибосомными сайтами без появления или исчезновения последних. Утверждения Райнбергера и соавт. [18], что 18 мМ является границей между физиологическими и «нефизиологическими» концентрациями Mg^{2+} , основаны на результатах Хольшука и соавт. [28]. Последние действительно наблюдали, работая с фиксированной концентрацией Ac-Phe-тРНК^{Phe}, резкое уменьшение связывания пептидил-тРНК с двух до единицы при понижении концентрации Mg^{2+} с 20 до 10 мМ. Однако они не привели никаких доказательств того, что концентрация пептидил-тРНК при всех концентрациях Mg^{2+} была насыщающей, и наблюдаемый ими эффект легко объясняется тем, что константа ассоциации Ac-Phe-тРНК^{Phe} с Р-сайтом падает в 20 раз, с А-сайтом — в 40 раз в диапазоне концентраций Mg^{2+} 20—10 мМ [19].

Относительное сродство различных форм тРНК

к рибосомным сайтам и гипотеза транслокации Ледера. Как видно из данных эксперимента на рис. 3, сродство деацелированной тРНК^{Phe} к Р-сайту в четыре раза выше, чем у аналога пептидил-тРНК, что качественно согласуется с результатами в [5, 6] и находится в противоречии с данными группы Гассена [4, 28]. Привлекая наши более ранние данные для аминоксил-тРНК [25, 26], мы можем теперь построить ряды относительного сродства всех трех форм тРНК к рибосомным сайтам при одних и тех же внешних условиях (15 мМ Mg²⁺, 20 мМ NH₄⁺ и 25 °С). Мы видим из данных рис. 9, что к А-сайту сродство уменьшается в ряду: аминоксил-тРНК > пептидил-тРНК > деацелированная тРНК. Это хорошо согласуется с предположениями Шрайера и Ноля [2] и Ледера [3]. Однако на Р-сайте наблюдается необычный порядок: сродство к Р-сайту увеличивается в ряду: пептидил-тРНК < аминоксил-тРНК < деацелированная тРНК. Аминоксил-тРНК имеет большее сродство к Р-сайту, чем пептидил-тРНК, которая, по Ледеру, является субстратом Р-сайта, а деацелированная тРНК со свободным 3'-концом, являющаяся продуктом Р-сайта, имеет к нему самое высокое сродство. Эти результаты находятся в резком противоречии с продукт-субстратными отношениями Ледера в его гипотезе.

Реальными субстратами пептидилтрансферазного центра являются только 3'-концевые части молекулы тРНК, и для минимальных донорного и акцепторного фрагментов соотношения, предсказанные Ледером, выполняются [29—32]. Однако уже при пентануклеотидных субстратах аминокислотный фрагмент САССА-Phe имеет одинаковое сродство с пептидилным фрагментом САССА-Phe←Ac к Р-сайту пептидилтрансферазного центра [33]. Сравнивая же абсолютные величины констант ассоциации 3'-концевых фрагментов тРНК [30, 32] с измеренными нами величинами для интактных молекул тРНК (рис. 9), приходим к следующим выводам: 1) 3'-концевые остатки вносят незначительный вклад в свободную энергию взаимодействия тРНК — рибосома, и обусловлено это, очевидно, тем, что основной вклад в это взаимодействие вносит не 50S субчастица, несущая пептидилтрансферазный центр, а 30S субчастица [34]; 2) взаимодействующая система тРНК — рибосома устроена так, что все три биологические формы тРНК имеют более высокое сродство к Р-, чем к А-сайту, и это, вероятно, термодинамически обеспечивает однонаправленность процесса транслокации. Необычный порядок сродства различных форм тРНК к Р-сайту (см. выше) обусловлен, возможно, различием в конформациях этих тРНК. По крайней мере, различные количества ионов магния, принимающих участие во взаимодействии пептидил-, аминоксил- и деацелированной тРНК с Р- и А-сайтами, являются значительным аргументом в пользу этого предположения.

Транслокация и Е-сайт. Чрезвычайно низкий уровень свободной энергии деацелированной тРНК на Р-сайте (рис. 3—5) может явиться препятствием для диффузионного механизма транслокации. Действительно, экстраполируя данные на рис. 4 в область низких значений Mg²⁺, находим, что даже при концентрации Mg²⁺ 2—3 мМ, 200 мМ NH₄⁺ и 25 °С (т. е. при условиях, достаточно близких *in vivo*), величина $K_t^P \approx 10^6$ М⁻¹. Сопоставляя эту величину с концентрацией рибосом (10^{-5} М) и стационарной концентрацией деацелированной тРНК (10^{-4} М) *in vivo* [35], приходим к выводу, что деацелированная тРНК не может спонтанно диссоциировать из Р-сайта, и необходим какой-то дополнительный механизм для ее выхода в раствор.

Такой механизм, заключающийся в том, что выходным является не Р-, а Е-сайт, был впервые предложен Нолем для рибосом из эукариот [36] и затем детализирован и в определенной мере экспериментально подтвержден для рибосом из *E. coli* в работе группы Нирхауса [37]. Действительно, если соотношение $K_t^P/K_t^E \approx 10^3$ ([17] и эта работа) верно и для условий *in vivo*, то константа ассоциации деацелированной тРНК с Е-сайтом в этих условиях равна $\sim 10^3$ — 10^4 М⁻¹.

В сочетании с высокими скоростями ассоциации — диссоциации деацилированной тРНК в Е-сайте [15] это значит, что спонтанная диссоциация тРНК из Е-сайта термодинамически и кинетически разрешена.

Поскольку кодон-антикодонное взаимодействие тРНК на Е-сайте, по данным Граевской с соавт. [15] и нашим [17], отсутствует, а отношение $K_i^P/K_i^E \approx 10^3$, мы предлагаем следующий механизм перехода деацилированной тРНК из Р- в Е-сайт. Этот переход сопровождается повышением свободной энергии тРНК на Р-сайте на 4—5 ккал/моль и разрывом кодон-антикодонного взаимодействия, энергия которого примерно и составляет на Р-сайте такую величину [34]. Роль сопряженной реакции, необходимой для такого повышения свободной энергии, могут играть реакция транспептидации и/или связывания EF-G-GTP и EF-G-зависимый гидролиз GTP.

QUANTITATIVE STUDY OF INTERACTION OF DEACYLATED tRNA WITH THE P, A AND E SITES OF *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES

Yu. P. Semenkov, E. M. Makarov, S. V. Kirillov

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

Summary

The association constants of deacylated tRNA^{Phe} for the P site of 70S ribosomes were measured in the presence and absence of poly(U), and at different Mg²⁺ concentrations and temperatures. The numbers of Mg²⁺ ions involved in this interaction were determined: 4.4±0.3 (+poly(U)) and 2.7±0.3 (—poly(U)). The association constant of tRNA^{Phe} for the A site was found to be 5·10³M⁻¹, much lower than that for the P site (2·10⁶M⁻¹), at 15 mM Mg²⁺, 200 mM NH₄⁺ and 25°C. The independence of the E-site binding of tRNA^{Phe} on the messenger RNA was confirmed under these medium conditions. Based on the data obtained the affinity orders of aminoacyl-, peptidyl-tRNA and deacylated tRNA for the P, A and E sites are determined, and a possible mechanism of involvement of the E site in the translocation process is discussed.

1. Rheinberger H. J., Nierhaus K. H. Simultaneous binding of three tRNA molecules by the ribosome of *Escherichia coli*.—Biochem. Int., 1980, 1, N 4, p. 297—303.
2. Schrier M. N., Noll H. Conformational changes in ribosomes during protein synthesis.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, N 2, p. 805—809.
3. Leder P. The elongation reaction in protein synthesis.—Adv. Protein Chem., 1973, 27, p. 213—242.
4. The peptidyl-substituent within peptidyl-tRNA increases the stability of tRNA—mRNA association / K. Hohlshuh, D. Schnierwitzki, M. Schmitt, H. G. Gassen.—FEBS Lett., 1982, 142, N 1, p. 125—128.
5. Peters M., Yarus M. Transfer RNA selection at the ribosomal A- and P-sites.—J. Mol. Biol., 1979, 134, N 3, p. 471—491.
6. 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.
7. Cantor C. R., Fairclough K. H. Fluorescence studies of the binding of yeast tRNA^{Phe} derivative to *Escherichia coli* ribosomes.—J. Mol. Biol., 1979, 132, N 4, p. 557—573.
8. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenkov Yu. P. Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Direct functional evidence that isolated 30S subunits contain two codon-specific binding sites for transfer RNA.—Nucl. Acids Res., 1980, 8, N 1, p. 183—196.
9. Кириллов С. В., Махно В. И., Семенов Ю. П. Влияние молекулярного веса поли(U) и присутствия рибосомного белка S1 на стабильность комплекса тРНК с малой субчастицей рибосом.—Докл. АН СССР, 1976, 229, № 2, с. 488—491.
10. Zubay Q. The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid.—J. Mol. Biol., 1962, 4, N 3, p. 347—356.
11. Семенов Ю. П., Махно В. И., Кириллов С. В. Выделение и изучение некоторых свойств высокоактивных 30S и 50S субчастиц рибосом *Escherichia coli*.—Молекуляр. биология, 1976, 10, № 4, с. 754—763.
12. Quantitative study of the interaction of aminoacyl-tRNA with the A site of *Escherichia coli* ribosomes. Equilibrium and kinetic parameters of binding in the absence of EF-Tu and GTP / K. Sh. Kemkhadze, V. B. Odintsov, Yu. P. Semenkov, S. V. Kirillov.—FEBS Lett., 1981, 125, N 1, p. 10—14.
13. Separation of transfer ribonucleic acid by sepharose chromatography using reverse salt gradients / W. M. Holmes, R. E. Hurd, B. R. Reid et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 72, N 4, p. 1068—1071.

14. Rappaport S., Lapidot Y. The chemical preparation of acetylaminoacyl-tRNA.— *Meth. Enzymol.*, 1974, **24**, part E, p. 685—693.
15. Grajevskaja R. A., Ivanov Yu. V., Saminsky E. M. 70S ribosomes of *Escherichia coli* have an additional site for deacylated tRNA binding.— *Eur. J. Biochem.*, 1982, **128**, N 1, p. 47—52.
16. Gillam I. C., Tener G. M. The use of BD-cellulose in separating transfer RNA's.— *Meth. Enzymol.*, 1971, **20**, part C, p. 55—70.
17. Kirillov S. V., Makarov E. M., Semenov Yu. P. Quantitative study of interaction of deacylated tRNA with *Escherichia coli* ribosomes. Role of 50S subunits in formation of the E site.— *FEBS Lett.*, 1983, **157**, N 1, p. 91—94.
18. Rheinberger H. J., Schilling S., Nierhaus K. H. The ribosomal elongation cycle: tRNA binding, translocation and tRNA release.— *Eur. J. Biochem.*, 1983, **134**, N 4, p. 421—428.
19. Kirillov S. V., Semenov Yu. P. Non-exclusion principle of Ac-Phe-tRNA^{Phe} interaction with the donor and acceptor sites of *Escherichia coli* ribosomes.— *FEBS Lett.*, 1982, **148**, N 2, p. 235—238.
20. The mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Heterogeneity of tRNA complexes with 70S ribosomes of *Escherichia coli* / S. V. Kirillov, V. I. Makhno, V. B. Odinzov, Yu. P. Semenov.— *Eur. J. Biochem.*, 1978, **89**, N 3, p. 305—313.
21. Gefier M. L., Russel R. L. Role of modification in tyrosine transfer RNA: a modified base affecting ribosome binding.— *J. Mol. Biol.*, 1969, **39**, N 1, p. 145—157.
22. Noll M., Noll H. Structural dynamics of bacterial ribosomes. V. Magnesium-dependent dissociation of light couples into subunits: measurements of dissociation constants and exchange rates.— *Ibid.*, 1976, **105**, N 1, p. 111—130.
23. Watanabe S. Interaction of siomycin with the acceptor site of *Escherichia coli* ribosomes.— *Ibid.*, 1972, **67**, N 3, p. 443—457.
24. Wurmbach P., Nierhaus K. H. Codon-anticodon interaction at the ribosomal P (peptidyl-tRNA) site.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**, N 5, p. 2143—2147.
25. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах. Взаимодействие аминоксил-тРНК с 70S рибосомами *Escherichia coli* в отсутствие фактора элонгации EF-Tu и GTP / К. Ш. Кемхадзе, В. Б. Одинцов, В. И. Махно и др.— *Молекуляр. биология*, 1981, **15**, № 4, с. 779—789.
26. Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Codon-anticodon interaction of aminoacyl-tRNA at the ribosomal donor site / S. V. Kirillov, K. Sh. Kemkhadze, E. M. Makarov et al.— *FEBS Lett.*, 1980, **120**, N 2, p. 221—224.
27. Kinetic aspects of tetracycline action on the acceptor (A) site of *Escherichia coli* ribosomes / Yu. P. Semenov, E. M. Makarov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov.— *Ibid.*, 1982, **144**, N 1, p. 125—129.
28. Holschuh K., Riesner D., Gassen H. G. Steps of mRNA translocation in protein biosynthesis.— *Nature*, 1981, **293**, N 5834, p. 675—677.
29. Harris R., Pestka S. Studies on the formation of transfer ribonucleic acid—ribosome complexes. XXIV. Effect of antibiotics on binding of aminoacyl-oligonucleotides to ribosomes.— *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, N 4, p. 1168—1174.
30. Effect of puromycin analogs and other agents on peptidyl-puromycin synthesis on polyribosomes / S. Pestka, R. Vince, S. Daluge, R. Harris.— *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 1973, **4**, p. 37—43.
31. The donor site of the peptidyltransferase center of ribosomes. Equilibrium association constants of model substrates and inhibitors / M. Kukhanova, S. Streltsov, L. Victorova et al.— *FEBS Lett.*, 1979, **102**, N 1, p. 198—203.
32. Krayevsky A. A., Kukhanova M. K. The peptidyltransferase center of ribosomes.— *Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.*, 1979, **23**, p. 1—51.
33. Bourd S., Victorova L. S., Kukhanova M. K. On substrate specificity of the donor site of the *Escherichia coli* ribosomal peptidyltransferase center.— *FEBS Lett.*, 1982, **142**, N 1, p. 96—100.
34. Кириллов С. В. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах.— В кн.: *Итоги науки и техники*. М.: ВИНТИ, 1983, с. 5—98. (Сер. Биол. химия; Т. 18).
35. Gouy M., Grantham R. Polypeptide elongation and tRNA cycling in *Escherichia coli*: a dynamic approach.— *FEBS Lett.*, 1980, **115**, N 1, p. 151—155.
36. Noll H. Chain initiation and control of protein synthesis.— *Science*, 1966, **151**, N 3715, p. 1241—1245.
37. Rheinberger H. J., Nierhaus K. H. Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, N 14, p. 4213—4217.
38. 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.

Ленинград. ин-т ядерной физики
им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина

Получено 15.01.85