



УДК 577.217

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe С МАЛОЙ СУБЧАСТИЦЕЙ РИБОСОМЫ

Д. Б. Дорохов, В. С. Шварц, Ю. П. Семенков

Введение. Изучение термодинамических параметров связывания aa-тРНК с А-сайтом рибосомы сопряжено с рядом трудностей. Они возникают из-за достаточно быстрой и практически необратимой транспептидации, а также неустойчивости aa-тРНК к гидролизу сложноэфирной связи, в результате чего в экспериментальной системе всегда присутствует некоторое количество деацелированной тРНК, способной связываться со всеми известными тРНК-связывающими сайтами рибосомы.

Эти затруднения можно обойти, если вместо природной aa-тРНК использовать ее аналог — тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe [1], в которой аминокислотный остаток присоединен к тРНК по 3'-положению рибозы 3'-концевого аденозина амидной связью. В отличие от природной aa-тРНК амидная тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe практически не деацелируется в условиях, близких к физиологическим [2], благодаря чему в инкубационной смеси деацелированная тРНК отсутствует. Такой аналог, обладая акцепторной, не обладает донорной активностью, вследствие чего при связывании тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe с А-сайтом рибосомы, содержащей в Р-сайте такую же тРНК, транспептидация не идет [2], что в принципе позволяет количественно изучать равновесное взаимодействие aa-тРНК с А-сайтом рибосомы.

Однако применение тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe в качестве аналога природной aa-тРНК требует тщательного изучения степени соответствия ее моделируемому объекту. Для этого на первом этапе такой работы было изучено взаимодействие тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe с 30S субчастицей рибосомы в сравнении с природной Phe-тРНК^{Phe}.

Материалы и методы. Препараты 30S субчастиц рибосом *Escherichia coli* MRE-600 получены по методике [3]. Поли(U) («Reanal», Венгрия) фракционировали по [4] и в качестве матрицы использовали фракцию со средней молекулярной массой 30 000. Обогащенный препарат [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} (1500 пмоль/ед. A₂₆₀) получали по [3]. Препарат тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-[¹⁴C]Phe был синтезирован по [5] и обогащен до 1400 пмоль/ед. A₂₆₀ по [3].

Все эксперименты проводили при 0 °С в стандартном буферном растворе: 0,02 М трис-НСl, рН 7,4, 0,02 М MgCl₂, 0,2 М NH₄Cl, 0,001 М ЭДТА. 30S субчастицы перед экспериментом реактивировали в стандартном буфере 60 мин при 37 °С [6]. Антибиотики тетрациклин («Sergva», ФРГ) и эдеин («Calbiochem», США) применяли в конечной концентрации 10⁻⁴ и 10⁻⁵ М соответственно. Значение ν (среднее количество молекул тРНК, связанных с одной субчастицей рибосомы) определяли методом фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры. Сорбцию тРНК на фильтрах (в реакционных смесях, не содержащих 30S субчастицы) определяли в каждом эксперименте и вычитали из данных по связыванию тРНК в присутствии субчастиц. Детали экспериментов приведены в подписях к рисункам.

Результаты и обсуждение. Количество сайтов, связывающих тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe на 30S субчастице рибосомы. Комплекс 30S·поли(U) способен связывать две молекулы тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe (рис. 1, кривая 1). Ранее было показано, что aa-тРНК (Phe-тРНК^{Phe}), Ac-aa-тРНК (Ac-Phe-тРНК^{Phe}) и деацелированная тРНК (тРНК^{Phe}) также связываются в количестве двух молекул на 30S субчастицу, из чего был сделан вывод о наличии на 30S субчастице двух тРНК-связывающих сайтов [3, 7]. Эти сайты были идентифицированы в указанных

Принятые сокращения: aa-тРНК — аминоксил тРНК; Ac-aa-тРНК — ацетиламиноацил-тРНК.

работах как локализованные на 30S субчастице части А- и Р-сайтов 70S рибосомы. Логично предположить, что тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe связывается с этими сайтами 30S субчастицы.

Идентификация сайтов связывания тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe на 30S субчастице рибосомы. Поскольку на рибосоме экспериментально обнаружено наличие трех сайтов связывания для тРНК: А-, Р- и Е- (последний в работах [7—9]), а распределение этих сайтов по двум субчастицам рибосомы еще не

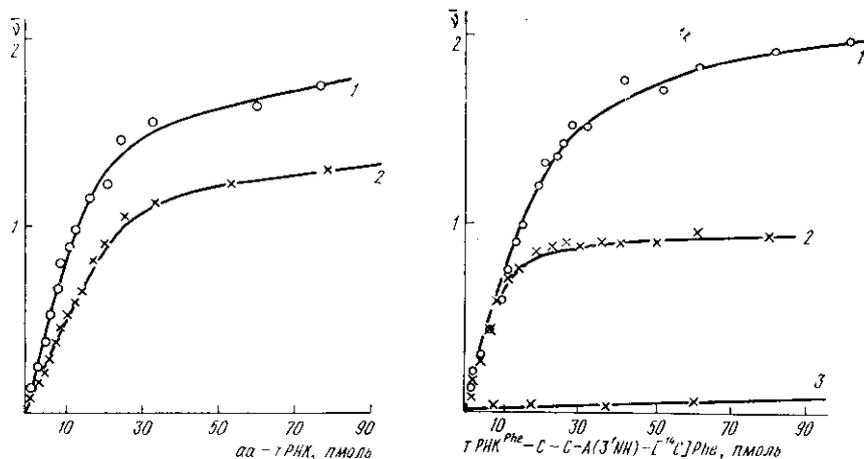


Рис. 1. Изотермы адсорбции тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-[¹⁴C]Phe (1) и [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} (2) на 30S субчастицах в присутствии поли(U). Инкубационная смесь (0,3 мл) содержала 10 пмоль 30S, 10 мкг поли(U) и указанное количество aa-тРНК; время инкубации 3 ч.

Fig. 1. The binding isotherms of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-[¹⁴C]Phe (1) and [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (2) to 30S subunits in the presence of poly(U). The incubation mixture (0.3 ml) contained 10 pmol 30S, 10 μg poly(U) and a variable amount of tRNA. The incubation time is 3 h.

Рис. 2. Изотермы адсорбции тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-[¹⁴C]Phe на 30S-поли(U) комплексе в отсутствие антибиотиков (1); в присутствии тетрациклина (2); тетрациклина и эдеина совместно (3). Инкубационная смесь (0,2 мл) содержала 10 пмоль 30S, 10 мкг поли(U) и указанное количество тРНК; время инкубации 3 ч.

Fig. 2. The binding isotherms of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-[¹⁴C]Phe to 30S-poly(U) complex in the absence of antibiotics (1); in the presence of tetracycline (2); and the presence of tetracycline+edeine (3). Incubation mixture (0.2 ml) contained 10 pmol 30S, 10 μg poly(U) and a variable amount of tRNA. The incubation time is 3 h.

установлено окончательно [10, 11], были поставлены специальные эксперименты по идентификации двух сайтов связывания тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe на 30S субчастице рибосомы.

Результаты, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что два сайта 30S субчастицы для связывания тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe аналогичны А- и Р-сайтам для связывания других типов тРНК с 30S субчастицей. Это следует из того, что связывание одного из них подавляется тетрациклином (А-сайт), а связывание в обоих сайтах подавляется совместным действием тетрациклина и эдеина (рис. 2).

Из рис. 3 видно, что связывание тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe с малой субчастицей рибосомы сильно зависит от наличия матрицы.

Для сравнения на рис. 1 (кривая 2) представлены также результаты по связыванию 30S субчастицей эквимольных количеств Phe-тРНК^{Phe} в тех же экспериментальных условиях, что для тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe. Как видно из рисунка, природная Phe-тРНК^{Phe} связывается двумя сайтами 30S субчастицы несколько слабее, чем ее амидный аналог. Это может быть обусловлено различием в третичной структуре природной aa-тРНК и ее аналога, что, возможно, и отражается на их сродстве к тРНК-связывающим сайтам 30S субчастицы рибосомы (условия данного эксперимента исключают ощутимое деацилирование Phe-тРНК^{Phe}).

Определение равновесных констант связывания тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe сайтами 30S субчастицы. На рис. 4 представлена изотерма адсорбции тРНК^{Phe}-С-С-А(3'NH)-Phe Р-сайтом (сильным сайтом, нечувстви-

тельным к действию тетрациклина) 30S субчастицы в присутствии поли(U). Константу ассоциации тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe с Р-сайтом 30S субчастицы — K_a^P определяли, как в [12] из соотношения $1/\beta = 1/\gamma K_a^P r + 1/\gamma$, где β — доля тРНК, связанной с субчастицами, γ — доля активной в связывании тРНК, r — концентрация свободного комплекса 30S·поли(U). Из результатов, представленных на рис. 4, следует, что $K_a^P = (3,15 \pm 0,35) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Значение $1/\gamma = 1$ (рис. 4), следовательно, вся тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe активна в связывании с Р-сайтом 30S субчастицы в присутствии матрицы.

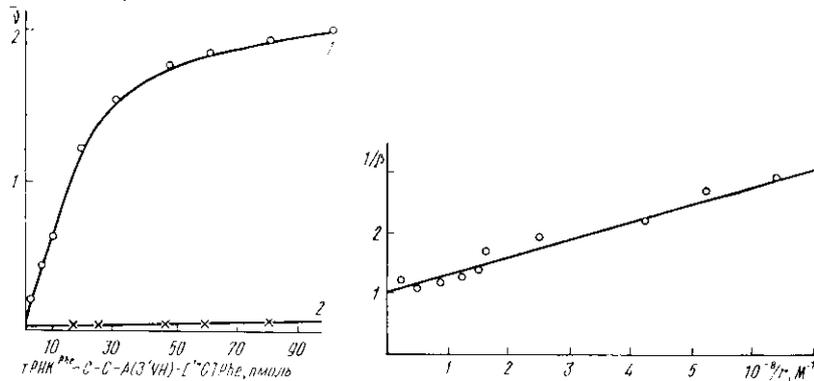


Рис. 3. Изотермы адсорбции тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-[¹⁴C]Phe на 30S субчастицах в присутствии (1) и в отсутствие (2) поли(U). Инкубационная смесь (0,2 мл) содержала 10 пмоль 30S, 10 мкг поли(U) и указанное количество тРНК; время инкубации 3 ч. Fig. 3. The binding isotherms of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-[¹⁴C]Phe to 30S subunits in the presence (1) and in the absence of poly(U) (2). Each incubation mixture (0.2 ml) contained 10 pmol 30S, 10 μg poly(U) and variable amount of tRNA. The incubation time is 3 h.

Рис. 4. Связывание тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-[¹⁴C]Phe с Р-сайтом 30S субчастицы в присутствии поли(U), представленное в виде зависимости $1/\beta$ от $1/r$, измеренное методом переменных объемов (детали см. в [12]). Инкубационная смесь (0,1—5 мл) содержала 10 пмоль 30S, 6,25 пмоль тРНК и 10 мкг поли(U); время инкубации 3 ч.

Fig. 4. The binding of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-[¹⁴C]Phe to the P-site of 30S subunit in the presence of poly(U). Results are represented as a plot of $1/\beta$ versus $1/r$ using the method of variable volumes (details in [12]). Incubation mixture (0.1-5 ml) contained 10 pmol 30S, 6.25 pmol tRNA and 10 μg poly(U). The incubation time is 3 h.

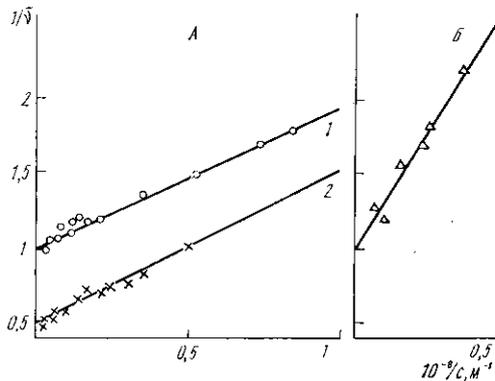


Рис. 5. Изотермы адсорбции тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-[¹⁴C]Phe. А. На комплексе 30S·поли(U) (из рис. 2) представлены в виде зависимости $1/\sqrt{v}$ от обратной концентрации лиганда С в инкубационной среде: 1 — связывание в присутствии тетрациклина; 2 — без него. Б. На слабом сайте комплекса 30S·поли(U), рассчитана на основании А.

Fig. 5. The binding isotherms of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-[¹⁴C]Phe. A. To the 30S poly(U) complex (from Fig. 2), given as a plot of $1/\sqrt{v}$ versus inverse tRNA concentration C in the incubation mixture: 1 — binding in the presence of tetracycline; 2 — in the absence of tetracycline. B. To a «weak» site of the 30S poly(U) complex, calculated from the data in Fig. 5 (A).

tetracycline; 2 — in the absence of tetracycline. B. To a «weak» site of the 30S poly(U) complex, calculated from the data in Fig. 5 (A).

Результаты экспериментов по связыванию тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe с 30S × поли(U) комплексом (рис. 2) представлены в виде зависимости $1/\sqrt{v}$ от $1/c$ на рис. 5, А. На основании измерений значения K_a^P и данных, представленных на рис. 5, А была рассчитана равновесная константа ассоциации (K_a^A) тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe с А-сайтом 30S субчастицы (расчет, как в [7, 10]). Из рис. 5, Б следует, что $K_a^A \sim 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Таким образом, константа ассоциации тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe с А-сайтом 30S·поли(U) комплекса на порядок величины меньше, чем таковая для Р-сайта. Та же закономерность была обнаружена для природной aa-тРНК — Phe-тРНК^{Phe} [10].

В работах по изучению активности 30S субчастицы обходится молчанием вопрос о количестве тРНК-связывающих сайтов на малой субчастице рибосомы, а иногда просто принимается утверждение как аксиома, что имеется только один сайт [13—15]. В данной работе нам удалось еще раз продемонстрировать наличие двух сайтов связывания тРНК на малой субчастице рибосомы для аналога aa-тРНК, что, безусловно, подтверждает универсальность двухсайтовой модели 30S субчастицы, предложенной ранее [3]. По-видимому, из-за низкой активности препаратов 30S субчастиц некоторым авторам не удается обнаружить второй сайт для связывания тРНК на 30S субчастице.

Константы ассоциации природной aa-тРНК и ее амидного аналога с А- и Р-сайтами 30S субчастицы в идентичных условиях близки, по нашим оценкам, различия лежат в пределах порядка измеряемой величины. Подробные данные по связыванию Phe-тРНК^{Phe} с 30S субчастицей приводятся в обзоре Кириллова [10]. Некоторые различия в уровне связывания тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe и Phe-тРНК^{Phe} с 30S×Хполи(U) комплексом (рис. 1) можно объяснить предполагаемым изменением конформации антикодонной области амидной aa-тРНК. Известно, что равновесные константы связывания тРНК^{Phe} и синтезированной антикодонной шпильки тРНК^{Phe} с 30S×Хполи(U) комплексом практически не различаются [16]. На этом основании делается предположение, что любая форма тРНК взаимодействует с 30S субчастицей рибосомы в основном только антикодонной шпилькой. В связи с этим результаты, представленные на рис. 1, дают основание предположить, что модификация 3'-концевого аденозина влияет на конформацию антикодонной шпильки. Это предположение подтверждает ряд экспериментальных данных, показывающих, что какое-либо (функциональное или нефункциональное) изменение, происходящее в C—C—A-конце тРНК, может приводить к конформационным перестройкам как удаленных от 3'-конца участков тРНК, так и всей ее третичной структуры [17—20].

Исходя из представленных результатов видно, что основные характеристики связывания природной aa-тРНК и ее амидного аналога с 30S субчастицей рибосомы близки. Это позволяет использовать тРНК^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe в качестве стабильного аналога, адекватного природной aa-тРНК, в экспериментах по изучению взаимодействия aa-тРНК с малой субчастицей рибосомы.

Авторы выражают благодарность С. Б. Бурду за плодотворное сотрудничество.

INTERACTION OF tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-Phe WITH SMALL SUBUNIT OF *ESCHERICHIA COLI*

D. B. Dorokhov, V. S. Shwarts, Yu. P. Semenkou

The Department of Plant Genetics,
Academy of Sciences of the Moldavian SSR, Kishinev
B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Gatchina, Leningrad

Summary

The thermodynamic parameters of binding of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)Phe (a stable analogue of aminoacyl-tRNA) to 30S ribosomal subunit are studied. In the presence of template 30S subunit binds 2 molecules of tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-Phe to the acceptor (A) and peptidyl (P) sites. The affinity constants of the stable analogue of aminoacyl-tRNA for tRNA-binding sites of the small ribosomal subunit are measured: $K_n^P = (3.5 \pm 0.35) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $K_n^A \sim 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. The results obtained indicate the great similarity in binding characteristics between Phe-tRNA^{Phe} and tRNA^{Phe}-C—C—A(3'NH)-Phe. It permits applying tRNA^{Phe}-C-C-A(3'NH)-Phe as a very convenient model to study interaction between aminoacyl-tRNA and 30S subunit.

1. *Sprinzi M., Cramer F.* The —C—C—A end of tRNA and its role in protein biosynthesis.— *Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.*, 1979, **22**, p. 1—69.
2. *Fraser T. H., Rich A.* Synthesis and aminoacylation of 3'-deoxy transfer RNA and its activity in ribosomal protein synthesis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, N 9, p. 2671—2675.
3. *Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenkou 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.

4. *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. Makno, S. V. Kirillov.—*Ibid.*, N 2, p. 403—421.
5. *Sprinzi M., Sternbach H.* Enzymatic modification of the C—C—A terminus.—*Meth. Enzymol.*, 1979, 59, p. 182—190.
6. *Пешин Н. Н., Кириллов С. В.* Природа гетерогенности 30S рибосомных субчастиц *in vitro*. II. Два типа инактивации 30S субчастиц рибосом *Escherichia coli*.—*Молекуляр. биология*, 1979, 13, № 4, с. 752—759.
7. *Kirillov S. V., Makarov E. M., Semenov Yu. P.* Quantitative study of interaction of deacylation tRNA with *Escherichia coli* ribosomes.—*FEBS Lett.*, 1983, 157, N 1, p. 91—94.
8. *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.
9. *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.
10. *Кириллов С. В.* Механизмы кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах.— В кн.: *Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ*, 1983, с. 5—97.— (Сер. Биологическая химия; т. 18).
11. *Кириллов С. В., Семенов Ю. П.* Взаимодействие тРНК с рибосомами.— *Молекуляр. биология*, 1984, 18, № 5, с. 1249—1263.
12. *Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes* / S. V. Kirillov, K. Sh. Kemkhadze, E. M. Makarov et al.—*FEBS Lett.*, 1980, 120, N 2, p. 221—224.
13. *Odom O. W., Stöffler G., Hardesty B.* Movement of the 3'-end of 16S RNA towards S21 during activation of 30S ribosomal subunits.—*Ibid.*, 1984, 173, N 1, p. 155—158.
14. *Chiaruttini C., Milet M., Hayes D.* Structural differences between active and inactive 30S ribosomal subunits revealed by RNA—protein crosslinking.—*Ibid.*, p. 90—94.
15. *Ohsawa H., Gualerzi C.* Chemical modification *in situ* of *Escherichia coli* 30S ribosomal proteins by the site-specific reagent pyridoxal phosphate. Inactivation of the aminoacyl-tRNA and mRNA binding sites.—*J. Biol. Chem.*, 1983, 258, N 1, p. 150—156.
16. *Uhlenbeck O. C., Lowary P. T., Wittenberg W. L.* Role of the constant uridine in binding of yeast tRNA^{Phe} anticodon arm to 30S ribosome.—*Nucl. Acids Res.*, 1982, 10, N 11, p. 3341—3352.
17. *Binding of complementary oligonucleotides to aminoacylated tRNA^{Phe} from yeast* / O. Pongs et al.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, 71, N 4, p. 1025—1033.
18. *Crothers D. M., Cole P. E.* Conformational changes of tRNA.— In: *Transfer RNA* / Ed. S. Altman. London: MIT press, 1978, p. 197—247.
19. *Gassen H. G.* Ligand-induced conformational changes in ribonucleic acids.—*Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol.*, 1980, 24, p. 57—86.
20. *Nagamatsu K., Miyazawa Y.* Magnesium cation induced conformational change of yeast tRNA^{Phe} as studied by singlet-singlet energy transfer.—*J. Biochem.*, 1983, 94, N 6, p. 1967—1971.

Отдел генетики растений АН МССР, Кишинев
Ленинград. ин-т ядерной физики
им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина

Получено 09.04.85

УДК 547.963.3

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ГИПОАЛЬБУМИНЕМИИ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА

А. В. Лекис, Л. Ю. Лукошявичюс, М. И. Коваленко, О. В. Булдакова

Снижение количества альбумина в сыворотке крови при различных патологических состояниях, в том числе при инфаркте миокарда, показано как в клинических исследованиях, так и на различных экспериментальных моделях. Вместе с тем, молекулярные механизмы развития гипоальбуминемии практически не изучены. Согласно данным, полученным нами ранее [1], в первые сутки экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ) уменьшается доля мембраносвязанных рибосом в суммарном пуле рибосом печени. Как известно, с этим классом рибосом связан синтез сывороточного альбумина в клетках печени [2]. В настоящей работе изучен уровень синтеза альбумина и суммарных белков печени *in vivo* и *in vitro* и определено время синтеза «средней» полипептидной цепи в печени после ЭИМ.