



# Структура и функция биополимеров

УДК 577.217

## СВЯЗЫВАНИЕ ФРАГМЕНТА ФЕНИЛАЛАНИНОВОЙ тРНК ДРОЖЖЕЙ, СОДЕРЖАЩЕГО АНТИКОДОНОВУЮ ПЕТЛЮ, С 30S СУБЧАСТИЦАМИ И 70S РИБОСОМАМИ *Escherichia coli*

С. А. Нехай, Е. М. Самшский

**Введение.** Первые попытки изучения связывания фрагментов тРНК, содержащих антикодонную петлю, с рибосомами были предприняты в 1968—1969 гг. Дьюбом и др., показавшими, что изолированная шпилька тРНК<sup>Met</sup>, содержащая антикодон, в присутствии матрицы связывалась с 30S субчастицами и 70S рибосомами из *E. coli* так же, как и целая тРНК, причем существенным было наличие стабильного антикодонного стебля [1, 2]. Количественно изучали поли(U)-зависимое связывание антикодонной шпильки фенилаланиновой тРНК из дрожжей с 30S субчастицами рибосом при 0°C Уленбек и др. [3]. Они подтвердили необходимость стабильного антикодонного стебля для связывания, показали, что сродство отдельной шпильки и целой тРНК одинаково и что оба эти лиганда связываются с одним и тем же местом на 30S субчастицах [3]. Однако отсутствие обратимости реакции связывания фрагмента, наблюдавшееся в работе Уленбека, заставляет усомниться в правильности полученной константы ассоциации. Кроме того, авторы использовали препараты сравнительно малоактивных субчастиц; для 70S рибосом константа связывания фрагмента вообще не была измерена. В настоящей работе доказана термодинамическая обратимость поли(U)-зависимого связывания антикодонной шпильки дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> с 30S субчастицами при 20—37°C, определены значения констант скорости и равновесия. При этом использовали препараты высокоактивных субчастиц, способных связывать до двух молекул тРНК на субчастицу [4].

**Материалы и методы.** 30S субчастицы и 70S рибосомы, выделенные из *E. coli* MRE-600 согласно [4], предоставлены В. И. Махно. Поли(U) с молекулярной массой около 30 000 приготовлена в соответствии с [5]. Тринуклеотид АрАрGr выделен из Т<sub>1</sub>-РНКазного гидролизата дрожжевой РНК [6]. Дрожжевая тРНК<sup>Phe</sup> (около 1600 нмоль на 1 ед. A<sub>260</sub>) выделена по методу [7], тРНК<sup>Phe</sup> из *E. coli* (также 1600 нмоль на 1 ед. A<sub>260</sub>) предоставлена Ю. П. Семенковым. Деацелированная дрожжевая [<sup>14</sup>C]тРНК<sup>Phe</sup>, меченная по 3'-концу, предоставлена Д. В. Парфеновым. Т4-полинуклеотидкиназа и Т4-РНК-лигаза — НИКТИ БАН (СССР), γ-[<sup>32</sup>P]АТФ — ВО «Изотоп» (СССР). В работе использовали тетрациклин («Serva», ФРГ), эдени «Calbiochem» (США), 4-гидроксимеркурибензоат натрия (ПХМБ) «Reanal» (ВНР), нитроцеллюлоз-

Принятые обозначения:  $\gamma$  — доля связавшегося с 30S субчастицами (70S рибосомами) фрагмента (или тРНК);  $\bar{\nu}$  — количество фрагмента (тРНК), связанное рибосомами (моль/моль);  $R$ ,  $C$  — равновесные концентрации соответственно свободных 30S субчастиц (70S рибосом) и фрагмента (тРНК).

ные фильтры «Synrog 6» (ЧССР) с диаметром пор 0,3—0,5 мкм. Бычий сывороточный альбумин (BCA, «Calbiochem»).

Додекануклеотидный фрагмент АрСмрUpGmrArArYpYpm<sup>32</sup>PUpGr выделяли из Т<sub>1</sub>-РНКазного гидролизата дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> согласно [3]. Затем его метили <sup>32</sup>P по 5'-концу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и идентифицировали частичным секвенированием в полиакриламидном геле (ПААГ) и определением меченого 5'-нуклеотида [8]. Удельная радиоактивность фрагмента определялась после микроколоночной хроматографии. Радиоактивно меченный 15-нуклеотидный фрагмент (Ф15) был получен присоединением тринуклеотида АрАрG с 5-стороны к фосфорилированному додекамеру с помощью Т4-РНК-лигазы с последующей очисткой электрофорезом в 25 %-ном ПААГ [3]. Удельная радиоактивность очищенного Ф15 считалась равной радиоактивности додекамера и составляла от 80 до 160 Бк/пмоль.

Все эксперименты проводили, если специально не оговаривается, в буфере ТАМ (0,02 М трис-НСl, рН 7,2, 0,02 М MgCl<sub>2</sub>, 0,2 М NH<sub>4</sub>Cl, 1 мМ ЭДТА). Концентрация поли(U) при этом была постоянной и достаточно высокой (насыщающей, 100 мкг/мл). Для определения количества комплекса пробы (объемом 100 мкл) фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр при соответствующей температуре без разбавления и промывали два раза по 1 мл буфера ТАМ. Использовали обычно два фильтра диаметром 12 мм, положенные друг на друга. Такой прием позволяет предотвратить неполную адсорбцию, а определение радиоактивности нижнего фильтра отдельно дает возможность оценить степень этой неполноты на верхнем фильтре. Фон без рибосом составлял менее 1 %, без поли(U) — 6—8 % всей радиоактивности пробы.

При низкой концентрации рибосом они довольно быстро теряли способность к связыванию тРНК и Ф15. Поэтому для стабилизации в пробы с концентрацией рибосом меньшей, чем 10<sup>-7</sup> М, добавляли BCA (50—200 мкг/мл).

Для каждого препарата Ф15 находили долю фрагмента, способную связаться с рибосомами ( $\gamma_0$ ). Ее определяли линейной экстраполяцией  $\gamma$  к бесконечно высокой концентрации  $R$  на графике зависимости  $1/\gamma$  от  $1/R$ . Для всех использовавшихся препаратов при всех условиях  $\gamma_0$  была не меньшей, чем 0,85.

Реакцию 30S субчастиц с ПХМБ проводили при концентрации последнего  $2 \times 10^{-4}$  М и 25 °С 1 ч в буфере ТАМ без ЭДТА.

**Результаты и обсуждение. Кинетика ассоциации.** Примеры кинетических кривых показаны на рис. 1, а. Константы скорости ассоциации,  $k_+$ , рассчитанные в предположении о том, что реакция бимолекулярна, определяются как угол наклона графика на рис. 1, б (линеа-

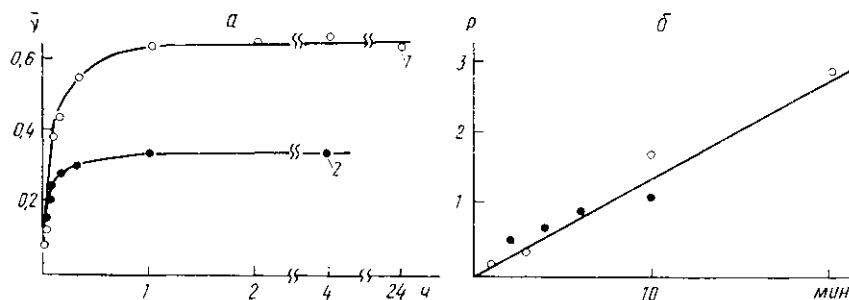


Рис. 1. Кинетика ассоциации Ф15 с 30S — поли(U): а — 62 нМ 30S, 50 нМ [<sup>32</sup>P]Ф15, 0 °С (1); 71 нМ 30S, 42 нМ [<sup>32</sup>P]Ф15, 20 °С (2); б — линейзация тех же кривых ( $\rho$  — бимолекулярный параметр, определенный в уравнении (7) из работы [9]). Угол наклона прямой дает  $k_+ = (2,3 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$

Fig. 1. Association kinetics of [<sup>32</sup>P]F15 with 30S — poly(U): а — 62 нМ 30S, 50 нМ [<sup>32</sup>P]Ф15, 0 °С (1); 71 нМ 30S, 42 нМ [<sup>32</sup>P]Ф15, 20 °С (2), б — linear regression of the kinetic curves ( $\rho$  — bimolecular parameter determined in Eq. 7 [9]). The line gives  $k_+ = (2,3 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

ризация начальной части кинетических кривых [9]); они равны  $(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  для всех изученных температур.

**Кинетика диссоциации.** Поскольку тРНК<sup>Phe</sup> конкурирует с Ф15 за место на 30S субчастицах (см. ниже), то в присутствии большого избытка немеченой тРНК<sup>Phe</sup> в пробах будет наблюдаться практически только диссоциация радиоактивно меченого комплекса (рис. 2).

Линеаризация данных по [9] позволяет определить константу скорости диссоциации,  $k_-$ . Она равна  $(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$  для  $0^\circ\text{C}$  и  $(2,9 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  для  $20^\circ\text{C}$ .

Константы равновесия. Полученные результаты дают возможность оценить, хотя бы приблизительно, константу ассоциации  $K_a$  как отношение  $k_+/k_-$ . Для  $20^\circ\text{C}$  это отношение равно  $7,9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , а для  $0^\circ\text{C}$  —  $8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ .

В дальнейшем мы считали, что равновесие в системе достигается за время инкубации 3—10  $\tau$ , где  $\tau$  — характеристическое время для бимолекулярной реакции, определяемое константами ее скорости и кон-

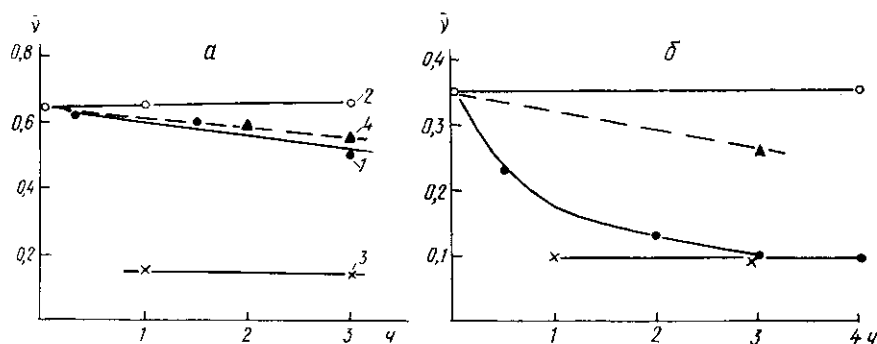


Рис. 2. Диссоциация преформированного комплекса  $[^{32}\text{P}] \text{ F15} - 30\text{S} - \text{поли}(\text{U})$  при  $0^\circ\text{C}$  (а) и  $20^\circ\text{C}$  (б): 1 — после добавления  $500 \text{ нМ}$  немеченой  $\text{tRNA}_{E.coli}^{\text{Phe}}$ ; 2 — контрольные пробы, инкубированные без добавления  $\text{tRNA}_{E.coli}^{\text{Phe}}$ ; 3 — контрольные пробы, в которых к  $30\text{S} - \text{поли}(\text{U})$  добавляли смесь  $[^{32}\text{P}] \text{ F15}$  с  $\text{tRNA}_{E.coli}^{\text{Phe}}$ ; 4 — постепенная деградация комплекса без добавления БСА

Fig. 2. Dissociation of  $[^{32}\text{P}] \text{ F15} - 30\text{S} - \text{poly}(\text{U})$  complex at  $0^\circ\text{C}$  (a) and  $20^\circ\text{C}$  (b): 1 — after addition of  $500 \text{ nM}$  of unlabelled  $\text{tRNA}_{E.coli}^{\text{Phe}}$ ; 2 — control probes incubated without  $\text{tRNA}_{E.coli}^{\text{Phe}}$  addition; 3 — control probes where the mixture of  $[^{32}\text{P}] \text{ F15}$  and unlabelled  $\text{tRNA}_{E.coli}^{\text{Phe}}$  was added to  $30\text{S} - \text{poly}(\text{U})$ ; 4 — gradual degradation of the complex, without addition of serum albumin

центрациями компонентов (см., например, [10]). Для наименьших рабочих концентраций соответствующие оценки дали  $\tau$  порядка 1 ч при  $0^\circ\text{C}$  и 5—15 мин при  $20$  и  $37^\circ\text{C}$ . Как и в работе [3], для определения  $K_a$  мы инкубировали небольшое фиксированное количество  $\text{F15}$  с различными количествами  $30\text{S}$  субчастиц в присутствии  $\text{поли}(\text{U})$ . На рис. 3 приведены данные для трех температур. Пунктиром отмечены теоретические кривые (изотермы Лэнгмюра), рассчитанные с учетом того, что 85% препарата  $\text{F15}$  способны связываться, и в предположении, что каждая субчастица имеет один сайт. Хотя ниже показано существование двух таких сайтов, предположение оправдано тем, что при избытке субчастиц по отношению к лиганду последний связывается, естественно, только на более «сильном» сайте. Рисунок демонстрирует, что хорошо аппроксимируются только данные, полученные в присутствии сывороточного альбумина. В его отсутствие количество комплекса получается тем меньшим, чем ниже концентрация  $30\text{S}$  субчастиц.  $K_a$  рассчитывается как концентрация свободных  $30\text{S}$  субчастиц на уровне 50% от максимального связывания  $\text{F15}$ . При  $20^\circ\text{C}$  она близка к приведенному выше отношению  $k_+/k_-$  (данные приведены в подписи к рис. 3). При  $0^\circ\text{C}$   $K_a$  на порядок меньше величины этого отношения. По данным рис. 3 оценили энтальпию и энтропию взаимодействия  $\text{F15}$  с  $30\text{S} - \text{поли}(\text{U})$  в диапазоне  $20 - 37^\circ\text{C}$ . Они составляют соответственно  $-70 \pm 5 \text{ кДж/моль}$  и  $-93 \pm 7 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ .

Тем же способом мы определили  $K_a$  для  $[^{14}\text{C}] \text{ tRNA}_{\text{yeast}}^{\text{Phe}}$ . При  $20^\circ\text{C}$  она равна  $(5 \pm 0,3) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  и практически совпадает с константой ассоциации  $\text{F15}$ , что согласуется с [3]. Эту систему также оказалось необходимым стабилизировать добавлением БСА.

Количество мест на 30S субчастице. Из рис. 4 следует, что при достаточно высоких концентрациях Ф15 последний связывается поли(U)-зависимо с двумя сайтами 30S субчастицы. Результат графического разложения кривой в координатах Скэтчарда по методу [11] показан на рис. 4, б, сплошными линиями и позволяет оценить константы ассоциации с каждым из сайтов. Они различаются на порядок величины  $((6 \pm 1) \cdot 10^7$  и  $(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^7$   $M^{-1}$  соответственно). Изотермы,

Рис. 3. Определение констант равновесия при связывании Ф15 с 30S — поли(U): 1, 2 — время инкубации 3,5 ч при 0 °С; 3, 4 — 2 ч при 20 °С; 5, 6 — 40 мин при 37 °С; 1, 3, 5 — инкубация в присутствии БСА; 2, 4, 6 — без него. Пробы объемом 100 мкл содержали 0,5–2,5 пмоль  $[^{32}P]$ Ф15 (20–200 Бк) и 1–1000 нМ 30S субчастиц. Штриховой линией показаны изотермы Лэнгмура;  $K_a$  подобраны по наилучшему соответствию экспериментальным точкам ( $1,0 \times 10^8$   $M^{-1}$  для 0 °С;  $4,0 \cdot 10^7$   $M^{-1}$  для 20 °С;  $0,83 \cdot 10^6$   $M^{-1}$  для 37 °С)

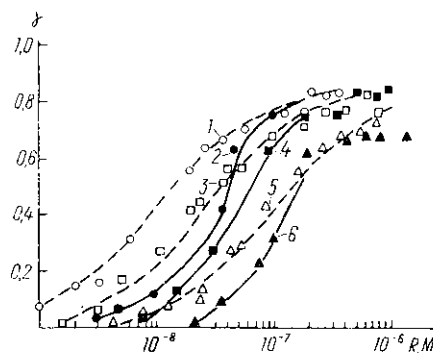


Fig. 3. Determination of binding constants of  $[^{32}P]$ F15 to 30S-poly(U): 1, 2 — incubation time — 3.5 h at 0 °С; 3, 4 — 2 h at 20 °С; 5, 6 — 40 min at 37 °С; 1, 3, 5 — incubation with serum albumin, 2, 4, 6 — incubation without serum albumin. Probes contained 0.5–2.5 pmol of  $[^{32}P]$ F15 (20–200 Bq) and 1–1000 nM of 30S subunits in volume of 100  $\mu$ l. The broken line indicate the Langmuir isotherms calculated for the best fit. They provide  $K_a=1 \cdot 10^8$   $M^{-1}$ ,  $4 \cdot 10^7$   $M^{-1}$  and  $8.3 \cdot 10^6$   $M^{-1}$  for 0 °С, 20 °С and 37 °С, respectively

приведенные на рис. 3, относятся, естественно, только к более «сильному» из сайтов, поскольку определялись при избытке субчастиц по отношению к Ф15.

Описанная картина качественно и даже количественно близка к наблюдавшейся при связывании интактной тРНК<sup>phe</sup><sub>yeast</sub> в тех же условиях (два сайта с константами ассоциации  $(8 \pm 2) \cdot 10^7$  и  $(1,0 \pm 0,2) \times 10^7$   $M^{-1}$  при 20 °С, рисунок не приводится) и к описанной ранее при связывании Phe-тРНК<sup>phe</sup> [4, 12].

Взаимодействие Ф15 с 30S — поли(U) подавляется  $10^{-5}$  M эдином не менее чем в 100 раз (рис. 4, а). Точки, соответствующие связыванию Ф15 в присутствии тетрациклина, располагаются между показанными на рис. 4, б, изотермами для «сильного» и «слабого» сайтов.

Взаимодействие Ф15 с 70S рибосомами. График Скэтчарда, приведенный на рис. 5, сходен с графиком на рис. 4, б, т. е. ясно показывает, что поли(U)-зависимое связывание Ф15 с полными рибосомами 70S также происходит на двух сайтах с неодинаковым родством. Разложение по методу [11] позволяет оценить константы ассоциации. Они оказываются близкими к соответствующим константам для связывания Ф15 с 30S — поли(U) ( $(4 \pm 1) \cdot 10^7$  и  $(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^7$   $M^{-1}$ ). Тетрациклин в этом случае четко подавляет связывание Ф15 только со «слабым» сайтом, не влияя на «сильный» (рис. 5).

Ассоциация с сильно связывающим сайтом может быть определена отдельно в условиях избытка рибосом по отношению к Ф15. S-образная кривая, полученная в тех же условиях, что и кривые на рис. 3 (здесь не приводится), дает  $K_a = (6 \pm 1) \cdot 10^7$   $M^{-1}$  при 20 °С.

Добавление БСА для стабилизации было необходимым и в этой системе.

Зависимость сродства Ф15 к 30S — поли(U) от концентрации ионов магния. Эту зависимость определяли при 20 °С по изотермам, аналогичным приведенным на рис. 3, т. е. только для сильно связывающего сайта. Оказалось, что в диапазоне от 10 до 30 мМ  $Mg^{2+}$  константа ассоциации не меняется, а при 5 мМ  $Mg^{2+}$  уменьшается в три раза, т. е. зависимость слабая.

Конкуренция между Ф15 и тРНК<sup>phe</sup> при связывании с 30S — поли(U). При конкуренции должно быть справедливо соотношение  $K'_d =$

$= K_d + (K_d/K_i) \cdot C_i$ , где  $K'_d$  — «кажущаяся» константа диссоциации лиганда (в данном случае  $[^{32}\text{P}]\Phi 15$ ), измеренная в присутствии ингибитора (в данном случае немеченой тРНК<sup>Phe</sup>);  $K_d$  — истинная константа диссоциации лиганда без ингибитора;  $K_i$  и  $C_i$  — соответственно константа диссоциации и концентрация ингибитора (см., например, [13], с. 652). Рис. 6 показывает, что зависимости  $K'_d$  от  $C_i$  действительно линейны. В соответствии с приведенной выше формулой наклон прямых дает отношение  $K_d/K_i$ . Оно оказалось равным 1,4, когда ингибитором была тРНК<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub> и 0,7 — когда

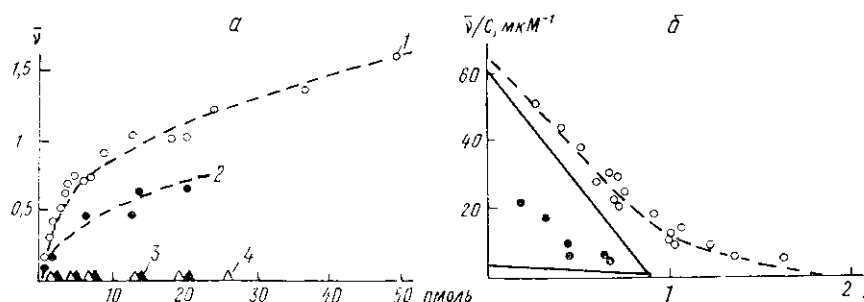


Рис. 4. Связывание  $[^{32}\text{P}]\Phi 15$  с 30S — поли(U) при 20 °C (1); то же в присутствии  $1 \cdot 10^{-4}$  М тетрациклина (2) и  $1 \cdot 10^{-5}$  М эдеина (3); 4 — контрольные пробы без поли(U). Концентрация 30S субчастиц 20–80 нМ, время инкубации 2 ч. Сплошными линиями показан результат графического разложения изотермы в координатах Скэтчарда по методу [11]

Fig. 4. Association of  $[^{32}\text{P}]\Phi 15$  with 30S-poly(U) at 20 °C (1); the same in the presence of  $1 \cdot 10^{-4}$  M tetracycline (2) and in the presence of  $1 \cdot 10^{-5}$  M edeine (3); control probes without poly(U) (4). Concentration of 30S subunits is 20–80 nM, incubation time — 2 h. The solid lines indicate the isotherms for two sites calculated graphically [11]

ингибитором была тРНК<sup>Phe</sup><sub>E.coli</sub>. Таким образом, тРНК<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub> и тРНК<sup>Phe</sup><sub>E.coli</sub> связываются с 30S — поли(U) на тех же сайтах, но первая в 1,4 раза сильнее, а вторая во столько же раз слабее, чем  $\Phi 15$ .

Phe-тРНК<sup>Phe</sup> [4, 12] и тРНК<sup>Phe</sup> [14] связываются с двумя сайтами 30S — поли(U). Этот процесс блокируется эдеином [12, 14]. Тетрациклин блокирует только связывание со «слабым» сайтом [4]. Добавление 50S субчастицы к комплексу 30S — поли(U), содержащему две молекулы Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, приводит к немедленному образованию дифенилаланина [4]. На основании этих данных был сделан вывод о том, что более сильно связывающий сайт является частью Р-сайта, а более слабо — частью А-сайта полной рибосомы. Здесь показано, что  $\Phi 15$  связывается практически так же, как интактная тРНК<sup>Phe</sup>: имеются два сайта, сродство обоих лигандов одинаково на каждом из них (по данным прямых измерений и конкуренции), одинаково слабая зависимость  $K_d$  от концентрации  $\text{Mg}^{2+}$ . Сходны также и кинетические характеристики процесса (данные для тРНК<sup>Phe</sup> здесь не приводятся). Логично предположить, что более сильное связывание  $\Phi 15$  также происходит на Р-, а более слабое — на А-сайте.

Правда, опыты с тетрациклином, в отличие от системы с Phe-тРНК<sup>Phe</sup><sub>E.coli</sub>, не дают этому ясного подтверждения. Возможно, что отличие связано с имитацией  $\Phi 15$  антикодоновой ветви не тРНК<sup>Phe</sup><sub>E.coli</sub>, а тРНК<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub>. Анализ данных работы [12] показывает аналогичный нечеткий характер влияния тетрациклина в системе 30S — поли(U) — Phe-тРНК<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub>.

Влияние эдеина не только подтверждает, что  $\Phi 15$  взаимодействует с Р- и А-сайтами субчастицы, но и показывает, что мишенью действия ингибитора служит именно участок связывания антикодоновой ветви тРНК.

Сходство кинетических и равновесных характеристик доказывает, что тРНК<sup>Phe</sup> не взаимодействует с 30S — поли(U) никакими центрами,

лежащими вне области, соответствующей Ф15 (вне N27—N42), т. е. вывод, сделанный ранее в работе [3], полностью подтверждается. Тем же самым остается и сродство Ф15 к 70S — поли(U), т. е. структура связывающих Ф15 участков А- и Р-сайтов остается одинаковой и на субчастице и на полной рибосоме. Единственная разница состоит в том, что в полной рибосоме тетрациклин подавляет только слабо связывающий сайт, не затрагивая «сильного», а на 30S субчастице он влияет на оба сайта (рис. 4 и 5). Насколько существенно это различие и в чем его причина — пока неясно.

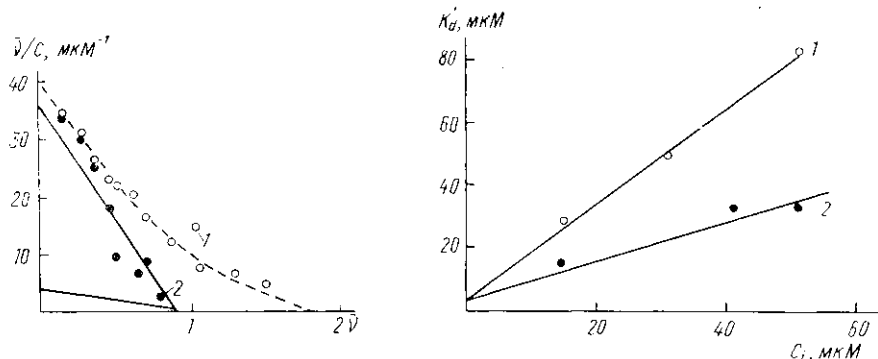


Рис. 5. Связывание  $[^{32}\text{P}]\text{F15}$  с 70S — поли(U): 1 — пробы содержали 20—80 нМ 70S рибосом; 2 — то же в присутствии  $1 \cdot 10^{-4}$  М тетрациклина. Инкубацию проводили 2 ч при 20 °С. Сплошными линиями показан результат графического разложения изотермы по методу [11]

Fig. 5. Association of  $[^{32}\text{P}]\text{F15}$  with 70S-poly(U): 1 — probes contained 20-80 нМ 70S ribosomes; 2 — the same in the presence of  $1 \cdot 10^{-4}$  M tetracycline. The incubation time was 2 h at 20 °C. The solid lines indicate the isotherms for two sites calculated graphically [11]

Рис. 6. Конкуренция Ф15 с деацилированной тРНК<sup>Phe</sup> за связывание с 30S — поли(U): к пробам, содержащим 50 нМ 30S, добавляли 20 нМ  $[^{32}\text{P}]\text{F15}$  в смеси с 1500—5000 нМ тРНК<sup>Phe</sup> из дрожжей (1) или из *E. coli* (2) и инкубировали 2 ч при 20 °С

Fig. 6. Competition between F15 and deacylated tRNA<sup>Phe</sup> for binding to 30S-poly(U). Mixture of 20 нМ  $[^{32}\text{P}]\text{F15}$  and 1500—5000 нМ deacylated tRNA<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub> (1) or tRNA<sup>Phe</sup><sub>E.coli</sub> (2) was added to the probes containing 50 нМ 30S subunits and incubated 2 h at 20 °C

На сильно связывающем (предположительно, Р) сайте сродство Ф15 к 30S — поли(U) более чем на порядок величины превышает сродство в растворе пары молекул тРНК (тРНК<sup>Glu</sup> — тРНК<sup>Phe</sup>) со взаимно комплементарными антикодонами [15]. Еще большие различия выявляет сравнение скоростей диссоциации этих комплексов: при 20 °С разница достигает четырех порядков величины. Несомненно, что рибосома участвует во взаимодействии антикодоновой ветви тРНК с матрицей, увеличивая как сродство, так и энергию активации. Это обстоятельство, а также и тот факт, что антикодоновая ветвь тРНК на 70S рибосоме является главным, а на 30S субчастице — и единственным участком молекулы, способным связываться, хорошо согласуются с гипотезой А. П. Поталова [16, 17]. Увеличенная энергия активации, возможно, вызвана необходимостью конформационной перестройки компонентов во время взаимодействия.

Первые количественные данные Уленбека и др. [3] оказались неточными по ряду причин. Здесь показано, что даже при 0 °С система недостаточно стабильна. При стабилизации добавлением БСА процесс связывания Ф15 с 30S — поли(U) выходит на плато через час (вместо 10 мин по [3]). Нестабильность в работе [3] явно имела место: это сказывалось на форме экспериментальных кривых, которые отличались от изотерм Лэнгмюра. Очевидно, что система не достигала равновесия. Естественно, что значение найденной нами константы ассоциации при 0 °С в 10—15 раз превышает величину, найденную

Уленбеком с сотр. Мы обнаружили также, что при 0 °С отношение  $k_+/k_-$  на порядок величины превышает  $K_a$ . Эту ситуацию не удастся адекватно описать в предположении, что связывание протекает в две стадии: при подборе параметров не удастся получить кривой кинетики с быстрым выходом на плато, как на рис. 1, а, без дальнейшего медленного нарастания количества комплекса. Возможно, что медленное нарастание на самом деле имеет место, но маскируется нестабильностью системы, и в результате  $K_a$  при 0 °С оказывается заниженной. Отношение  $k_+/k_-$  равно  $8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  и, вероятно, истинное значение  $K_a$  находится в диапазоне от  $1 \cdot 10^8$  до  $8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Экстраполяция к 0 °С данных, полученных при 20 и 37 °С, дает промежуточное значение  $K_a = 3,3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ . При 20 °С и выше равновесие легко достигается и  $K_a$  определяется достаточно точно.

Уленбек с сотр. не обнаружили второго сайта на 30S субчастицах. Как отмечают сами авторы, причина, возможно, заключается в отличии препарата субчастиц, приготовленных менее щадящим методом. Другими причинами могут быть нестабильность комплекса в отсутствие БСА или неполная адсорбция его на фильтрах. Только применение описанного в разделе «Материалы и методы» способа фильтрации через двойной фильтр позволило нам избежать неполной адсорбции.

Неясен пока вопрос о причинах нестабильности системы при длительной инкубации. Отчасти нестабильность может быть связана с окислением SH-групп, поскольку мы обнаружили, что ПХМБ полностью подавляет последующее связывание тРНК<sup>Phe</sup> и Ф15 (данные не приведены). С другой стороны, добавление β-меркаптоэтапола не стабилизировало системы. То, что причина нестабильности не связана с диссоциацией рибосомных белков, показано в [3]. Таким образом, роль стабилизирующего влияния БСА остается пока не выясненной.

Авторы выражают благодарность В. И. Махно, Ю. П. Семенкову, В. И. Катунину и Д. В. Парфенову за предоставленные препараты, а также А. А. Вострову и А. Б. Мерину — за участие в работе на первом ее этапе.

#### BINDING OF YEAST tRNA<sup>Phe</sup> WITH ANTICODON ARM TO *ESCHERICHIA COLI* 30S SUBUNITS AND 70S RIBOSOMES

S. A. Nekhay, E. M. Saminsky

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

#### Summary

The 15-nucleotide analog of the yeast tRNA<sup>Phe</sup> anticodon arm binds reversibly two sites of *E. coli* poly(U)-programmed 30S ribosomal subunits. There is a competition between the tRNA<sup>Phe</sup> fragment and tRNA<sup>Phe</sup> for this binding. It is blocked totally by edeine and partially by tetracycline. The site with higher affinity for fragment has been characterized by association and dissociation rate constants and by equilibrium affinity constant. The second site reveals the affinity constant at 20 °C one order of magnitude lower.

70S ribosomes bind the fragment quantitatively and qualitatively in almost the same way as 30S subunits.

The association of the fragment with 30S subunits is quite similar to analogous association of Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (Kirillov S. V. et al., 1980, Nucl. Acids Res., 8, 186-193). It permits supposing by analogy with the latter that the site with high affinity for the fragment can be presumably identified as a part of the P-site, and the site with lower affinity — as a part of the A-site of ribosome.

1. A structural requirements for codon-anticodon interaction on the ribosome / S. K. Dubbe, P. S. Rudland, B. F. C. Clark, K. A. Mareker // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1969.—34.—P. 161—166.

2. Rulland P. S., Dube S. K. Specific interaction of an initiator tRNA fragment with 30S ribosomal subunits // *J. Mol. Biol.*—1969.—43, N 2.—P. 273—280.
3. Rose S. J., Lozary P. T., Uhlenbeck O. C. Binding of yeast tRNA<sup>Phe</sup> anticodon arm to *Escherichia coli* 30S ribosomes // *Ibid.*—1983.—167, N 1.—P. 103—117.
4. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Y. 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.
5. Comparative study of the interaction of polyuridylic acid with 30S subunits and 70S ribosomes of *Escherichia coli* // V. I. Katutin, Y. P. Semenov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov // *Ibid.*—N 2.—P. 403—421.
6. Aoyagi S., Inoue J. Isolation of dinucleotides and seven trinucleotides from RNA-ase T<sub>1</sub> digest of nucleic acids and their UV spectral characterization // *J. Biol. Chem.*—1968.—243, N 3.—P. 511—520.
7. Litt M. A simple procedure for the purification of tRNA<sup>Phe</sup> // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1968.—32, N 3.—P. 507—511.
8. Bocher B. R., Ames B. A. Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 16.—P. 9759—9769.
9. Riggs A. D., Bourgeois S., Cohn M. The *lac* repressor-operator interaction. 3. Kinetic studies // *J. Mol. Biol.*—1970.—53, N 3.—P. 401—417.
10. Kinetic studies on the Ser-tRNA<sup>Ser</sup> from yeast // A. Pingoud, D. Riesner, D. Boehme, G. Mass // *FEBS Lett.*—1973.—30, N 1.—P. 1—5.
11. Determination of binding parameters from Scatchard plots. Theoretical and practical consideration // H. G. Weder, Q. Schildknecht, R. A. Lutz, P. Kisselring // *Eur. J. Biochem.*—1974.—42, N 2.—P. 475—481.
12. Катутин В. И., Кириллов С. В. Связывание фенолаланиновой tPHK из дрожжей с рибосомами *Escherichia coli*. Влияние удаления модифицированного основания с 3'-стороны антикодона на келон-антикодоловое взаимодействие // *Молекуляр. биология.*—1981.—18, № 4.—С. 1486—1496.
13. Edsall J. T., Wyman J. Biophysical chemistry.—New York: Acad. press, 1958.—800 p.
14. 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.
15. Grosjean H., Soll D. G., Crothers M. Studies of the complex between transfer RNAs with complementary anticodons // *J. Mol. Biol.*—1976.—103, N 3.—P. 499—519.
16. Потанов А. И. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции // *Журн. общ. биологии.*—1985.—35, № 1.—С. 63—77.
17. Potanov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // *FEBS Lett.*—1982.—146, N 1.—P. 5—8.

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

Получено 16.12.87

УДК 577.113.6

## ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РЕСТРИКТАЗ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ (2'-5')ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ *in vitro*

З. Ю. Ткачук, Л. В. Ткачук, Е. И. Квасюк, Г. В. Зайцева,  
Е. И. Калининченко, И. А. Михайлопуло, Г. Х. Мацука

**Введение.** В последнее время значительно возрос интерес к изучению биохимических эффектов (2'-5') олигонуклеотидов. Он обусловлен в первую очередь установлением важной роли 5'-трифосфатов (2'-5') олигоадениловой кислоты [(2'-5')pppA<sub>n</sub>, главным образом n=3] в качестве ключевого медиатора одного из каскадов биохимических событий, вызываемых интерфероном [1—3]. Полагают, что путь биохимических превращений, включающий образование (2'-5')pppA<sub>n</sub>, дает основной вклад в противовирусный эффект интерферона [1—3]. Однако этим не исчерпывается биохимическое значение указанных олигоаденилатов. Было показано, что наряду с (2'-5')pppA<sub>n</sub> в клетках, обработанных интерфероном, присутствуют 5'-дефосфорилированные, «короткие» (2'-5') олигоаденилаты ((2'-5')A<sub>n</sub>, главным образом n=3) [4], количество которых, по-видимому, не зависит от концентрации (2'-5')pppA<sub>n</sub>. Более того, (2'-5')A<sub>3</sub> выполняют, по всей вероятности, само-