



Структура и функция биополимеров

УДК 577.217

О. В. Ковальчук, А. П. Потапов

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИКОДОНОВОЙ ВЕТВИ ДРОЖЖЕВОЙ ФЕНИЛАЛАНИНОВОЙ тРНК С МАЛЫМИ СУБЧАСТИЦАМИ РИБОСОМ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

Изолированная антикодonoвая ветвь тРНК^{Phe} связывается с 40S субчастицами рибосом по тем же местам и примерно с такой же эффективностью, что и целая молекула тРНК^{Phe}. Антикодonoвая ветвь дает основной энергетический вклад в образование комплекса тРНК с 40S субчастицами рибосом. Кооперативность связывания тРНК с А и Р сайтами эукариотических рибосом определяется взаимодействием декодирующего центра рибосомы с участками молекул тРНК, расположенными в пределах их антикодonoвых ветвей. Необходимым условием возникновения кооперативности является комплементарность кодон-антикодonoвых пар. Комплекс 40S субчастиц рибосом с изолированной антикодonoвой ветвью отличается от комплекса с целой молекулой тРНК по ряду характеристик.

Введение. тРНК связывается с А и Р сайтами программированных рибосом эукариот кооперативно [1]. Предполагается, что характер взаимодействия тРНК с рибосомой определяется прежде всего взаимодействием декодирующего центра рибосомы с кодон-антикодonoвым дуплексом [2, 3]. В качестве определенного приближения к такому дуплексу может служить кодон-антикодonoвый дуплекс с участием изолированной антикодonoвой ветви тРНК. Использование фрагмента тРНК позволяет судить о роли как этой, так и остальной части молекулы во взаимодействии с рибосомой и приблизиться к выяснению механизма взаимодействия тРНК с рибосомой.

Количественное изучение связывания антикодonoвой ветви дрожжевой тРНК с рибосомами *Escherichia coli* выявило сходство характеристик взаимодействия с А и Р сайтами рибосомы целой молекулы тРНК и ее изолированной ветви [4, 5]. Соответствующие данные по взаимодействию антикодonoвой ветви с эукариотическими рибосомами отсутствуют.

Основная задача данной работы состояла в выяснении роли антикодonoвой ветви в связывании тРНК с малыми субчастицами эукариотических рибосом и определении некоторых свойств тРНК-связывающих сайтов эукариотической рибосомы.

Материалы и методы. Т4-полинуклеотидкиназа и щелочная фосфатаза производства НПО «Фермент» (СССР), Т4-РНК-лигаза производства НИКТИ БАН (СССР). 40S субчастицы рибосом из печени кролика (65 % активных рибосом) [6] любезно предоставлены К. А. Солдаткиным, 30S субчастицы рибосом *E. coli* — В. И. Махно. Поли(У) с молекулярной массой около 30 000 приготовлена из коммерческого препарата поли(У) производства «Reanal» (ВНР) в соответствии с [7]. [γ -³²P]АТФ производства ВО «Изотоп» (СССР). тРНК^{-Phe} *E. coli* (препарат суммарной тРНК с пониженным содержанием тРНК^{Phe}

© О. В. КОВАЛЬЧУК, А. П. ПОТАПОВ, 1991

(1,7 пмоль в 1 о. е. A_{260}) предоставлена Ю. П. Семенковым. тРНК^{Phe} (1 500 пмоль в 1 о. е. A_{260}) выделена из дрожжей, как в [8]. тРНК метили ^{32}P по 5'-концу [9] и разбавляли немеченой тРНК, после чего удельная радиоактивность составляла 90—3000 Бк/пмоль. Олигонуклеотид AAGACmUGmAAUAψm5CUG (гN₁₅) — аналог антикодоновой ветви дрожжевой тРНК^{Phe} — получен, как описано в [4]. Его удельная радиоактивность 1 000—5 000 Бк/пмоль.

Все эксперименты по связыванию тРНК^{Phe} и гN₁₅ с рибосомами проводили в буфере: 0,02 М трис-НСl, рН 7,6, 0,02 М MgCl₂, 0,1 М NH₄Cl при 0—2 °С. Пробы объемом 20—50 мкл содержали 10 мкг

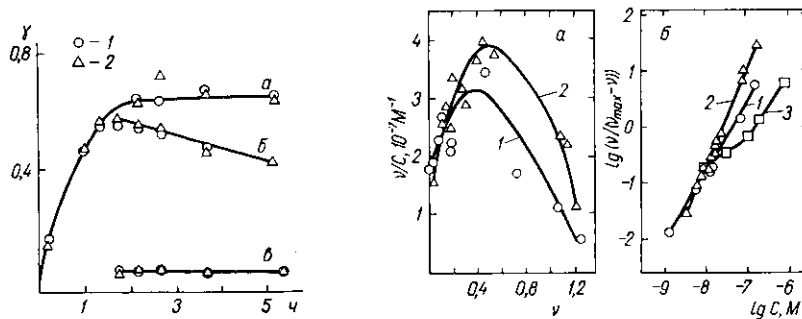


Рис. 1. Кинетика связывания тРНК^{Phe} (1) и гN₁₅ (2) с поли(У)-программированными 40S субчастицами рибосом (а) и их вытеснения немеченой тРНК^{Phe} (б). Инкубационная смесь содержала в 240 мкл буфера 16 пмоль 40S субчастиц, 120 мкг поли(У) и либо 13 пмоль тРНК^{Phe}, либо 8 пмоль гN₁₅. Порции инкубационной смеси объемом 20 мкл отбирали для определения радиоактивности комплекса лиганд — рибосома. После 130 мин инкубации смесь разделяли на две части (а, б) и в смесь (б) добавили в 2 мкл 100 пмоль немеченой тРНК^{Phe}; (в) — к рибосомам добавлена смесь немеченой тРНК^{Phe} с радиоактивным лигандом в количествах, эквивалентных количествам в смеси (б)

Рис. 2. Изотермы связывания тРНК^{Phe} (1) и гN₁₅ (2) с поли(У)-программированными 40S субчастицами рибосом, представленные в координатах Скэтчарда (а) и Хилла (б). Инкубационная смесь содержала в 50 мкл 2,2 пмоль 40S субчастиц рибосом и различные количества тРНК^{Phe} и гN₁₅

поли(У). Величину v (количество молей лиганда, связанного одним молем рибосом) или γ (долю связанного меченого лиганда от общего количества меченого лиганда, внесенного в пробу) определяли фильтрованием инкубационной смеси через нитроцеллюлозные фильтры [10].

Расчет сумм констант связывания с А и Р сайтами (без учета коэффициента кооперативности) ($K_A + K_P$), произведение этих констант и коэффициента кооперативности ($K_A \cdot K_P \cdot k_{AP}$) осуществляли, как в [11, 12]:

$$v = (k_1 C + k_2 C^2) / (1 + k_1 C + k_2 C^2),$$

где C — концентрация свободного лиганда в растворе; $k_1 = K_A + K_P$; $k_2 = K_A \cdot K_P \cdot k_{AP}$.

Коэффициент Хилла определяли в соответствии с [13].

Результаты и обсуждение. гN₁₅ связывается с поли(У)-программированной субчастицей рибосом (рис. 1). Время инкубации 3—4 ч является достаточным для достижения максимального уровня связывания для обоих лигандов. тРНК^{Phe} ингибирует связывание фрагмента и, более того, вытесняет уже связанный фрагмент из комплекса с субчастицей (рис. 1, б, в). Следовательно, имеет место конкуренция гN₁₅ и тРНК^{Phe} за места связывания на рибосомной субчастице.

На рис. 2 представлены результаты по связыванию [^{32}P]гN₁₅ и [^{32}P]тРНК^{Phe} с поли(У)-программированными 40S субчастицами рибосом. Характерная выпуклая форма кривых в координатах Скэтчарда указывает на ярко выраженную положительную кооперативность взаимодействия лиганда с тРНК-связывающими центрами рибосомы [14]. Соответственно коэффициент Хилла, характеризующий кооперативные процессы [13], больше единицы для обоих лигандов (таблица). Распо-

ложение кривых (γN_{15} над $tRNK^{Phe}$) свидетельствует о большем средстве антикодоновой ветви к программированной рибосоме.

Анализ кривых связывания γN_{15} и $tRNK^{Phe}$ (рис. 2) представлен в таблице. Определены суммы констант связывания с А и Р сайтами 40S субчастицы ($K_A + K_P$) и их произведение с коэффициентом кооперативности ($K_A \cdot K_P \cdot k_{AP}$). Чтобы вычислить величину каждой константы, необходимо определить либо одну из них, либо их отношение. Нужную информацию можно получить из кривых титрования рибосом, построенных в координатах Хилла. При таком представлении кривых удается выявить довольно незначительное различие в средстве к двум сайтам

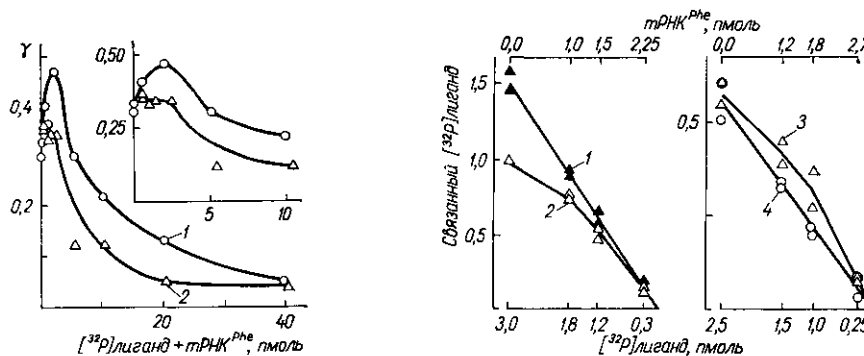


Рис. 3. Влияние меченой $tRNK^{Phe}$ на связывание $[^{32}P]tRNK^{Phe}$ (1) и $[^{32}P]\gamma N_{15}$ (2) с поли(U)-программированными 40S субчастицами рибосом. Пробы, содержащие в 50 мкл 2,3 пмоль 40S субчастиц и 0,005 пмоль $[^{32}P]tRNK^{Phe}$ или 0,47 пмоль $[^{32}P]\gamma N_{15}$ титровали меченой $tRNK^{Phe}$.

Рис. 4. Конкурентное связывание $tRNK^{Phe}$ и γN_{15} с поли(U)-программированными 30S (1) и 40S (2, 3) субчастицами рибосом. Инкубационная смесь содержала в 25 мкл буфера 2,1 пмоль 30S субчастиц и 2,55–3,0 пмоль смеси немеченой $tRNK^{Phe}$ и $[^{32}P]\gamma N_{15}$ (1); 1,67 пмоль 40S субчастиц и столько же лигандов (2), 1,47 пмоль 40S субчастиц и 2,5–2,95 пмоль смеси меченой $tRNK^{Phe}$ и $[^{32}P]\gamma N_{15}$ (3) или $[^{32}P]tRNK^{Phe}$ (4).

связывания. Так, 70S рибосомы *E. coli* связывают γN_{15} в двух сайтах, константы связывания в которых различаются в 3 раза. Это различие приводит к довольно значительному изгибу кривой титрования, построенной в координатах Хилла (рис. 2, б). Так как соответствующие кривые титрования 40S субчастиц рибосом имеют линейный вид в этих координатах, то $tRNK^{Phe}$, так же как γN_{15} , связывается с двумя равными по средству сайтами 40S субчастицы рибосом. При этом условии ($K_A = K_P$) коэффициенты кооперативности и индивидуальные для каждого сайта константы связывания могут быть вычислены довольно легко (таблица).

Если не учитывать коэффициенты кооперативности, то константы связывания $tRNK$ с рибосомой выше, чем у фрагмента. Видимо, по этой причине немеченая $tRNK^{Phe}$ стимулирует связывание γN_{15} слабее, чем связывание меченой $tRNK^{Phe}$ (рис. 3, а). В результате создается впечатление, что средство $tRNK$ к рибосоме выше по сравнению с изо-

Константы связывания $tRNK^{Phe}$ и γN_{15} с поли (U) -программированными 40 S субчастицами рибосом

Association parameters of $tRNA^{Phe}$ and rN_{15} with poly (U) programmed 40 S subunits

Лиганд	Коэффициент Хилла	$K_A \cdot K_P \cdot k_{AP}$, $10^{-14} M^{-2}$	$K_A + K_P$, $10^{-7} M^{-1}$	$K_A = K_P$, $10^{-7} M^{-1}$	k_{AP}
$tRNK^{Phe}$	1,3	5,2	2,4	1,2	4
γN_{15}	1,6	11,7	1,0	0,5	47

лированной антикодоновой ветвью, так как кривая титрования для гN₁₅ находится под кривой для тРНК^{Phe} (рис. 3).

Для доказательства того, что это не так, необходимо исключить влияние кооперативности, изменив условия конкурентного связывания. С этой целью суммарное количество [³²P]лиганда и немеченой тРНК^{Phe}, используемой в качестве ингибитора, сохранялось практически постоянным. Увеличению количества меченого лиганда соответствовало пропорциональное уменьшение количества ингибитора. В этих условиях при одинаковом средстве к рибосоме лиганда и ингибитора связывание меченого лиганда с рибосомой должно иметь линейный вид в координатах

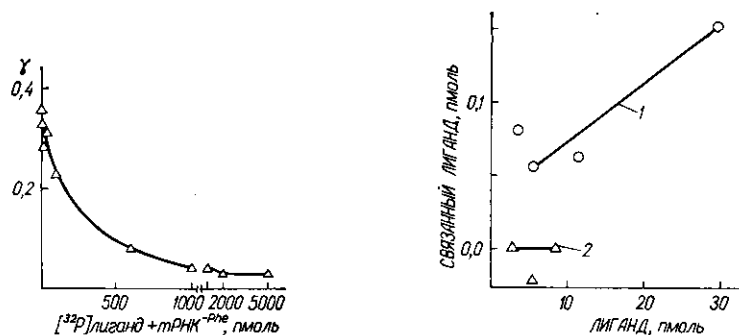


Рис. 5. Влияние немеченой тРНК^{-Phe} на связывание [³²P]гN₁₅ с поли(U)-программированными 40S субчастицами рибосом. Пробы, содержащие в 50 мкл 2,3 пмоль 40S субчастиц рибосом и 0,47 пмоль [³²P]гN₁₅, титровали немеченой тРНК^{-Phe}

Рис. 6. Связывание тРНК^{Phe} (1) и гN₁₅ (2) с 40S субчастицами рибосом в отсутствие матрицы. Пробы, содержащие в 25 мкл 3 пмоль 40S субчастиц, титровали [³²P]лигандом. По окончании инкубации непосредственно перед фильтрованием в пробу вносили 600 пмоль тРНК^{-Phe}. Контрольные пробы содержали тРНК^{-Phe} с начала инкубации. Определенный таким образом фоновый уровень связывания меченого лиганда с фильтрами вычитали из значения, полученного для каждой экспериментальной точки

натах зависимости количества связанного [³²P]лиганда от внесенного в пробу. Именно так выглядит связывание [³²P]тРНК^{Phe} в присутствии немеченой тРНК^{Phe} (рис. 4, кривая 4). При меньшем средстве ингибитора кривая связывания лиганда должна быть выпуклой. Такой вид имеет связывание [³²P]гN₁₅ в присутствии сРНК^{Phe} (кривые 2, 3).

Таким образом, поли(U)-программированные 40S субчастицы рибосом связывают изолированную ветвь лучше, чем целую молекулу тРНК. В случае поли(U)-программированных 30S субчастиц рибосом подобное различие в средстве фрагмента и тРНК отсутствует (рис. 4, кривая 1), что полностью соответствует результатам работ [4, 5].

40S субчастицы рибосом не связывают изолированную антикодоновую ветвь в отсутствие матрицы (рис. 5). Средство тРНК^{Phe} к субчастицам без поли(U) также невелико (рис. 5). Поэтому в качестве кодон-неспецифического связывания проще изучать ингибирование связывания с рибосомой меченой тРНК^{Phe} или гN₁₅ в присутствии поли(U) и возрастающих количеств тРНК^{-Phe}.

тРНК^{-Phe} ингибирует связывание гN₁₅ с обоими сайтами программированной рибосомы (рис. 6). Небольшого количества тРНК^{Phe}, обнаруженного в препарате тРНК^{-Phe} с помощью аминоацилирования (1,7 пмоль в 1 о. е. A₂₆₀ тРНК^{-Phe}), недостаточно для объяснения степени ингибирования. В отличие от кодонспецифичной тРНК^{Phe}, тРНК^{-Phe} не стимулирует связывания фрагмента при относительно низких концентрациях. Аналогичная ситуация наблюдалась для меченой тРНК^{Phe}.

Итак, ранее было показано, что антикодоновая ветвь дрожжевой тРНК^{Phe} взаимодействует с поли(U)-программированными малыми субчастицами рибосом *E. coli* так же, как целая тРНК^{Phe} [4, 5]. Мы обнаружили, что антикодоновая ветвь связывается также с малыми субчастицами эукариотических рибосом. Как и в случае тРНК, связыва-

нис антикодоновой ветви является кооперативным процессом. Именно кооперативность приводит к различию в связывающих свойствах антикодоновой ветви и тРНК.

Конкурентное связывание показало, что сродство антикодоновой ветви к поли(U)-программированной 40S рибосоме выше сродства тРНК (рис. 4). Это обусловлено тем, что кооперативный эффект связывания в случае ветви выражен сильнее. Если не учитывать вклад коэффициента кооперативности в величину констант связывания, то сумма последних окажется меньше для фрагмента по сравнению с тРНК (таблица).

Кодон-антикодоновое взаимодействие играет ключевую роль во взаимодействии антикодоновой ветви с рибосомой. В отсутствие матрицы связывания фрагмента не обнаружено, в то время как непрограммированные 40S субчастицы рибосом способны связывать тРНК. Очевидно, имеются дополнительные контакты тРНК с рибосомой.

Так как кодон-неспецифическая тРНК^{-Phe} не стимулирует связывания как тРНК, так и фрагмента, можно заключить, что для возникновения кооперативного эффекта необходимо образование комплементарных кодон-антикодоновых пар в обоих сайтах рибосомы. Представляет интерес тот факт, что тРНК^{-Phe} способна ингибировать связывание фрагмента с обоими сайтами рибосомы.

Таким образом, кооперативность взаимодействия тРНК с 40S субчастицами рибосом является результатом взаимодействия между декодирующим центром рибосомы и участками молекулы тРНК, расположенными в пределах ее антикодоновой ветви. Определяющее значение для возникновения кооперативного эффекта имеет комплементарность кодон-антикодоновых пар.

Полученные данные соответствуют гипотезе о прямом взаимодействии декодирующего центра рибосомы с кодон-антикодоновыми комплексами, постулирующей центральную роль этого взаимодействия в селекции тРНК рибосомой и предсказавшей возможность имитации изолированной антикодоновой ветвью поведения интактной тРНК при связывании с рибосомой [2, 3].

Авторы благодарят В. В. Махно, Е. М. Саминского, С. А. Нехая и К. А. Солдаткина за предоставленные препараты.

Резюме

Изолирована гілка, як і ціла молекула тРНК^{Phe}, кооперативно зв'язується з двома рівними за спорідненістю сайтами 40S субчастинки рибосом. Однак спорідненість фрагменту з рибосомою вища. Це обумовлено більшим в порівнянні з тРНК коефіцієнтом кооперативності утворення комплексу рибосоми з антикодоною гілкою. Коефіцієнт кооперативності дорівнює 4 для тРНК^{Phe} і 47 — для її антикодонової гілки; якщо коефіцієнт кооперативності не враховується, то константи зв'язування дорівнюють $1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (тРНК^{Phe}) та $0,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (гілка) для кожного сайту при 2 °C і 20 мМ концентрації Mg^{2+} . Вирішальне значення для виникнення кооперативного ефекту має комплементарність кодон-антикодонових пар. Виявлено кодон-незалежне зв'язування тРНК з малими субчастинками рибосом, в той же час антикодонова гілка не зв'язується з рибосомами при відсутності матриці.

Summary

The 15-nucleotide analog of the yeast tRNA^{Phe} anticodon arm appears to bind cooperatively to two equal in affinity sites of poly(U)-programmed 40S ribosome as well as intact tRNA^{Phe}. However the fragment affinity for the ribosome is higher. This is mostly contributed by higher cooperative coefficient for the anticodon arm-ribosome complex formation. Cooperativity coefficients are 4 for tRNA^{Phe} and 47 for its anticodon arm, meanwhile, if cooperativity coefficient is not considered, association constants are $1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (tRNA^{Phe}) and $0,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (the arm) for each site at 2 °C and 20 mM Mg^{2+} concentra-

tion. The correct codon-anticodon pairing is shown to play the key role in cooperativity origin. Template independent binding of tRNA to small ribosomal subunits is revealed, meanwhile, anticodon arm is not able to bind to 40S ribosomes in the absence of template.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Number of tRNA binding sites on 80S ribosomes and their subunits* / M. V. Rodnina, A. V. El'skaya, Yu. P. Semenov, S. V. Kirillov // FEBS Lett.—1988.— **231**, N 1.— P. 71—74.
2. *Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome* // Ibid.—1982.— **146**, N 1.— P. 5—8.
3. *Потапов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции* // Журн. общ. биологии.—1985.— **46**, № 1.— С. 63—77.
4. *Rose III S. J., Lowry P. T., Uhlenbeck O. C. Binding of yeast tRNA^{Phe} anticodon arm to Escherichia coli 30S ribosomes* // J. Mol. Biol.—1983.— **167**, N 1.— P. 103—117.
5. *Нехай С. А., Саминский Е. М. Связывание фрагмента фенилаланиновой тРНК из дрожжей, содержащего антикодонную петлю, с 30S субчастицами и 70S рибосомами Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—1989.— **5**, № 2.— С. 62—69.
6. *Falvey A. K., Staehelin T. Structure and function of mammalian ribosomes. I. Isolation and characterization of active liver ribosomal subunits* // J. Mol. Biol.—1970.— **53**, N 1.— P. 1—19.
7. *Кириллов С. В., Махно В. И., Семенов Ю. П. Влияние молекулярного веса поли(U) и присутствия белка S1 на стабильность комплекса тРНК с малой субчастицей рибосом* // Докл. АН СССР.—1976.— **229**, № 2.— С. 488—491.
8. *Role of a template sugar-phosphate backbone in the ribosomal decoding mechanism* / A. P. Potapov, K. A. Soldatkin, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya // J. Mol. Biol.—1988.— **203**, N 4.— P. 885—893.
9. *Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.— **74**, N 2.— P. 560—564.
10. *Nirenberg M., Leder P. RNA codewords and protein synthesis* // Science.—1964.— **145**, N 3639.— P. 1399—1407.
11. *Interaction of tRNA with the A and P site of rabbit-liver 80S ribosomes and their 40S subunits* / M. V. Rodnina, A. V. El'skaya, Yu. P. Semenov, S. V. Kirillov // Eur. J. Biochem.—1989.— **185**, N 3.— P. 563—568.
12. *Ackers G. K., Shea M. A., Smith F. R. Free energy coupling within macromolecules. The chemical work of ligand binding at the individual sites in co-operative systems* // J. Mol. Biol.—1983.— **170**, N 1.— P. 223—243.
13. *Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке.*— М.: Мир, 1980.— 407 с.
14. *Dahlquist F. W. The quantitative interpretation of maximum in Scatchard plots* // FEBS Lett.—1974.— **49**, N 2.— P. 267—268.

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

Получено 14.01.91

УДК 539.2+541.64+577.32

Г. Г. Новошинский, Е. В. Кузьмин, Р. И. Кузьмина

СВОЙСТВА СИСТЕМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ БИОПОЛИМЕРОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ И УРОВНЯ ВЛАЖНОСТИ

В отличие от мембран, обуславливающих пространственные размеры клеток, не рассматривался вопрос о принципах внутренней структурной организации и механизмах сохранения нативной структуры клеток при неблагоприятных факторах внешней среды, в частности при переходе клеток или организмов в состояние ксеро- или криоанабиоза. С позиции статистической физики делается попытка определить роль биополимеров в организации нативной структуры клеток и их защитную функцию при изменении температуры и влажности. Показано, что белки могут образовывать структурный каркас клетки и сохранять внутренние резервы для перехода к жизнедеятельному состоянию при возвращении в физиологические условия.

При рассмотрении проблемы устойчивости некоторых видов клеток и организмов к неблагоприятным факторам внешней среды вплоть до полной «остановки» жизнедеятельности (анабиоз) необходимо исследовать

© Г. Г. НОВОШИНСКИЙ, Е. В. КУЗЬМИН, Р. И. КУЗЬМИНА, 1991