

КОЛИЧЕСТВО тРНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ УЧАСТКОВ НА 80S РИБОСОМАХ И ИХ СУБЧАСТИЦАХ

М. В. Роднина, Ю. П. Семенков

Для изучения различных аспектов биосинтеза белка на молекулярном уровне крайне необходимо точное знание количества тРНК-связывающих участков (сайтов) на рибосоме и ее субчастицах. Можно считать установленным, что рибосомы из прокариот содержат три сайта: «канонические» Р (донорный) и А (акцепторный) и третий, Е (предположительно «выходной») сайт, специфический для деацелированной тРНК [1—5].

Что касается рибосом из эукариот, вопрос о количестве сайтов на 80S рибосоме и их распределении между субчастицами практически не изучен. Результаты экспериментов на 80S рибосомах интерпретируются в рамках традиционной двухсайтовой (А+Р) модели. Хотя третий сайт, специфический для деацелированной тРНК, был описан еще в 1965 г. Ветштейном и Нолем [6] именно для рибосом из эукариот, с тех пор не появилось ни одной работы, подтверждавшей его наличие на 80S рибосомах. В настоящей работе мы подтвердили данные работы [7] о наличии двух сайтов связы-

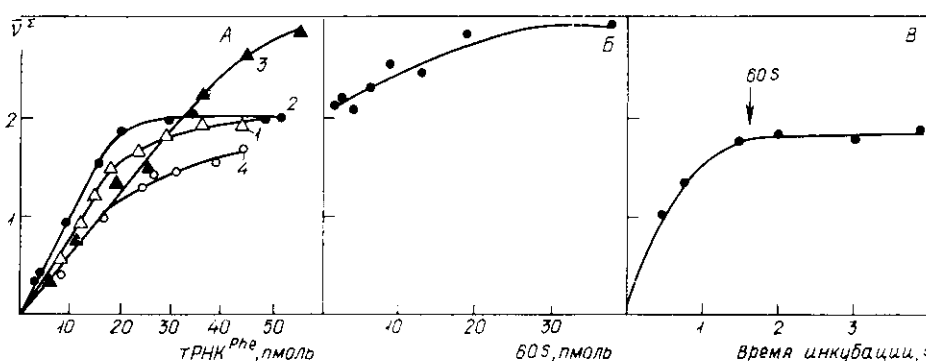


Рис. 1. Титрование 80S рибосом различными формами тРНК^{Phe} (А), вклад 60S субчастицы в формирование третьего сайта на 80S рибосоме (Б) и кинетика связывания пептидил-тРНК с рибосомами (Б): А — смеси, содержавшие в 50 мкл буфера ТАМ 10 пмоль 80S рибосом, 6 мкг поли(У) и переменные количества [¹⁴С]Phe-тРНК (1), Ac[¹⁴С]Phe-тРНК^{Phe} (2) и [¹⁴С]тРНК^{Phe} (3), инкубировали 60 мин при 0 °С, 4 — аналогичный эксперимент с пептидил-тРНК при 10 мМ Mg²⁺; Б — смеси, содержавшие в 50 мкл буфера ТАМ 10 пмоль 40S субчастиц, 6 мкг поли(У) и 64 пмоль [¹⁴С]тРНК^{Phe} инкубировали 90 мин при 0 °С, после чего к ним добавили переменные количества 60S субчастиц и инкубировали дополнительно 60 мин; Б — смеси, содержавшие в 20 мкл буфера ТАМ 10 пмоль 40S субчастиц, 4 мкг поли(У) и 98 пмоль Ac[¹⁴С]Phe-тРНК^{Phe}, инкубировали 100 мин при 0 °С и после добавления в смесь 20 пмоль 60S субчастиц продолжали измерение кинетики связывания

Fig. 1. Titration of 80S ribosomes with different tRNA^{Phe} forms (A), effect of 60S subunit on E-site formation (B), kinetics of peptidyl-tRNA binding to ribosomes (B): A — mixtures containing 10 pmol of 80S ribosomes, 6 μg poly(U) and variable amounts of [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (1), Ac[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (2), or [¹⁴C]tRNA^{Phe} (3) in 50 μl of buffer TAM. Incubation was performed for 60 min at 0 °C, 4 — the same experiment with peptidyl-tRNA at 10 mM Mg²⁺; B — mixtures containing 10 pmol of 40S subunits, 6 μg poly(U) and 64 pmol of [¹⁴C]tRNA^{Phe} in 50 μl of buffer TAM. After incubation for 90 min at 0 °C the variable amounts of 60S subunits were added and the incubation continued next 60 min; B — mixtures containing 10 pmol of 40S subunits, 4 μg poly(U) and 98 pmol of Ac[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} in 20 μl of buffer TAM. After 100 min of incubation at 0 °C 20 pmol of 60S subunits were added and the binding kinetics measurements were continued

вания любой из трех форм тРНК на 40S субчастице и показали, что 80S рибосома имеет два сайта связывания для аминоктил- и пептидил-тРНК и три сайта для деацелированной тРНК, а 60S субчастица содержит один сайт, имеющий достаточно высокое сродство к деацелированной тРНК^{Phe} ($K_a \sim 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) и практически не связывающий Phe-тРНК^{Phe} или AcPhe-тРНК^{Phe}.

Субчастицы рибосом из печени кролика получены по методу [8]. 80S рибосомы получали реассоциацией 40S субчастиц с избытком 60S субчастиц (1 : 2). При этом все

40S субчастицы входили в состав 80S рибосом, а количество свободных 60S субчастиц учитывалось при расчетах. Выделение обогащенных препаратов $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$, $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$, $[^{14}\text{C}]\text{tRNA}$ из *E. coli*, а также фракционированной по молекулярной массе поли(U) ($M_r \sim 30\ 000$) описано в [9].

Инкубационные смеси объемом 50–120 мкл готовили на буфере ТАМ (0,02 М трис-НСl, рН 7,4, 0,02 М MgCl_2 , 0,1 М NH_4Cl , 0,001 М ЭДТА) Величины \bar{v}^{Σ} (число молекул тРНК, связанных с одной рибосомой или субчастицей) определяли методом

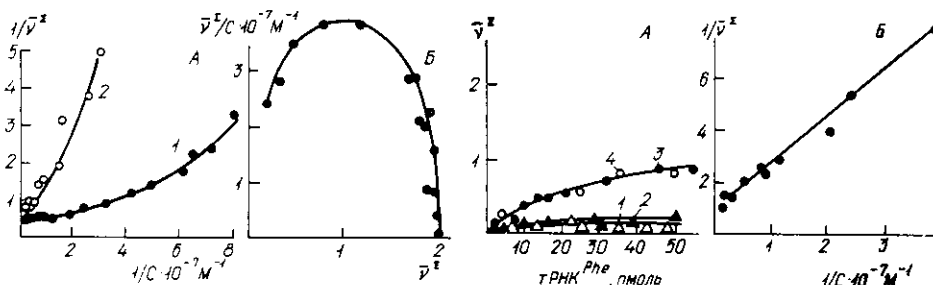


Рис. 2. Кривые титрования 80S рибосом $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$, выраженные: А — в двойных обратных координатах при 20 (1) и 10 (2) мМ Mg^{2+} ; Б — в координатах Скэтчарда при 20 мМ Mg^{2+} . Данные взяты из результатов экспериментов, представленных на рис. 1, А (кривые 2, 4). С — концентрация свободной тРНК

Fig. 2. Titration curves of $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ binding to 80S ribosomes represented in: А — $1/\bar{v}^{\Sigma}$ vs. $1/C$ plots at 20 mM Mg^{2+} (1) and 10 mM Mg^{2+} (2); Б — Scatchard plots at 20 mM Mg^{2+} . The experimental data are from Fig. 1, А (curves 2, 4)

Рис. 3. Титрование 60S субчастиц различными формами тРНК^{Phe} (А) и эксперимент с $[^{14}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Phe}}$, выраженный в двойных обратных координатах (Б): А — смеси, содержавшие в 50 мкл буфера ТАМ 8 пмоль 60S субчастиц и переменные количества $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ (1), $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ (2) и $[^{14}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Phe}}$ (3), инкубировали 60 мин при 0 °С, 4 — то же, что 3, но в присутствии 6 мкг поли(U)

Fig. 3. Titration of 60S subunits by different tRNA^{Phe} forms (А) and the experiment with $[^{14}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Phe}}$ expressed in $1/\bar{v}^{\Sigma}$ vs. $1/C$ plots (Б): А — mixtures containing 8 pmol of 60S subunits and variable amounts of $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ (1), $\text{Ac}[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ (2) or $[^{14}\text{C}]\text{tRNA}^{\text{Phe}}$ (3) were incubated for 60 min at 0 °C, 4 — the same as (3) but with 6 μg of poly(U)

фильтрации смесей через нитроцеллюлозные фильтры «Супрог» № 6 (ЧССР) [10]. Остальные детали экспериментов приведены в подписях к рисункам.

Используя метод титрования постоянного количества рибосом (или субчастиц рибосом) переменным количеством тРНК мы показали, что 40S субчастицы из печени кролика связывают по две молекулы аминоктил-, пептидил- или деацилированной тРНК, что согласуется с [7], причем уменьшение концентрации ионов Mg^{2+} с 20 до 5 мМ не меняет количества сайтов на малой субчастице, но понижает сродство тРНК к ним. Взаимодействие тРНК оказалось кодонзависимым с обоими сайтами.

На 80S рибосомах, реассоциированных из субчастиц, обнаружены два сайта связывания для аминоктил-тРНК (рис. 1, А, кривая 1), очевидно, Р и А. Пептидил-тРНК также связывается с обоими сайтами (рис. 1, А, кривая 2). Это свидетельствует о том, что «принцип исключения» для пептидил-тРНК, сформулированный в [11], неприменим к рибосомам не только прокариот [12], но и эукариот. В отличие от аминоктил- и пептидил-тРНК деацилированная тРНК, как показано на рис. 1, А, кривая 3, имеет три сайта связывания на 80S рибосомах, что подтверждает результаты работы [6]. На рис. 1, Б показано, что этот сайт «появляется» на 80S рибосомах вместе с добавлением 60S субчастиц к преформированному комплексу $[40\text{S} \cdot \text{поли}(\text{U}) \cdot (\text{тРНК}^{\text{Phe}})_2]$. Если 60S субчастицы добавлять к аналогичному комплексу с пептидил-тРНК, дополнительного связывания пептидил-тРНК с вновь образующимися 80S рибосомами не происходит (\bar{v}^{Σ} остается равным 2; рис. 1, В), что согласуется с экспериментом, представленным на рис. 1, А, кривая 2. Как и в случае с 40S субчастицами, понижение концентрации ионов Mg^{2+} ведет только к уменьшению сродств тРНК к рибосомным сайтам (рис. 1, А, кривая 4). Взаимодействие $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ с сайтами 80S рибосомы характеризуется явно выраженной кооперативностью, что видно из хода кривых титрования как в двойных обратных, так и координатах Скэтчарда (рис. 2, А, Б) [13].

В тех же пределах концентраций тРНК 60S субчастицы практически не связывают ацилированные формы тРНК^{Phe} (рис. 3, А, кривые 1 и 2), но способны связать одну

молекулу деацелированной тРНК^{Phe} (рис. 3, А, кривая 3) с константой ассоциации $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (рис. 3, Б). В отличие от 60S субчастиц связывание тРНК^{Phe} с 60S субчастицами кодоннезависимо, поскольку добавление поли(U) не влияет на величину K_a (рис. 3, А, кривая 4). Ранее Биссон и др. [13] показали, что 60S субчастицы из печени крысы содержат два сайта связывания для деацелированной тРНК. Один, с более высокой константой ассоциации ($K_a \sim 2,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$), был интерпретирован как Р-сайт, второй, с величиной $K_a \sim 1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, — как часть А-сайта. Однако, проанализировав экспериментальные данные этих авторов, мы пришли к выводу, что величины K_a в работе [13] завышены приблизительно на три порядка. С учетом этого при использованных нами концентрациях тРНК^{Phe} может реализоваться только один сайт с более высокой K_a . Поскольку Е-сайт 80S рибосомы и обнаруженный нами сайт на 60S субчастице специфичны для деацелированной тРНК, а Е-сайт на 80S рибосоме формируется ее 60S субчастицей, можно предположить, что эти сайты либо совпадают, либо 60S-сайт является частью Е-сайта, но не частью А- или Р-сайтов.

Результаты настоящей работы в сравнении с данными для 70S рибосом позволяют заключить, что, несмотря на значительные структурные различия в рибосомах из прокариот и эукариот, они подобны как в отношении количества тРНК-связывающих сайтов, так и в их распределении между субчастицами.

Авторы выражают благодарность А. В. Ельской и С. В. Кириллову за обсуждение статьи и полезные замечания, а также Г. В. Овчаренко, Т. Г. Шапкиной и В. И. Махно за содействие в выполнении работы.

THE NUMBER OF tRNA-BINDING SITES ON 80S RIBOSOMES AND THEIR SUBUNITS

M. V. Rodnina, Yu. P. Semenov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Gatchina

Summary

The ability of the rabbit liver ribosomes and their subunits to form complexes with different types of tRNA^{Phe} has been studied by the nitrocellulose membrane filtration technique. 80S ribosomes are shown to have two binding sites for aminoacyl- or peptidyl-tRNA, but three binding sites for non-acylated tRNA. The third (E) site of 80S ribosome is formed by its 60S subunit. The number of tRNA binding sites on 80S ribosomes or 40S subunits is constant at different Mg²⁺ concentrations (5-20 mM). The analysis of $1/\sqrt{v^2}$ vs. $1/C$ plot or Scatchard plot indicates that binding of AcPhe-tRNA^{Phe} to ribosomes is of a cooperative process. 60S subunit is shown to have one codon-independent binding site specific for non-acylated tRNA.

1. *Krayevskiy A. A., Kuchanova M. K.* The peptidyltransferase center of ribosomes // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*—1979.—23.— P. 1—51.
2. *Парфенов Д. В., Саминский Е. М.* Деацелированная тРНК связывается с 50S субчастицей рибосом *E. coli* на специальный участок, не совпадающий с участком Р // *Молекуляр. биология.*—1985.—19, № 5.— С. 1378—1383.
3. *Kirillov S. V., Semenov Yu. P.* Extension of Watson's model for the elongation cycle of protein biosynthesis // *J. Biomol. Struct. Dynam.*—1986.—4, N 2.— P. 263—269.
4. *Кириллов С. В.* Механизм кодон-антикодонного взаимодействия на рибосомах.— М.: ВИНТИ, 1983.— С. 5—98. (Итоги науки и техники.— Сер. Б.— Т. 18).
5. *Кириллов С. В., Семенов Ю. П.* Взаимодействие тРНК с рибосомами // *Молекуляр. биология.*—1984.—18, № 5.— С. 1246—1249.
6. *Wettstein F. O., Noll H.* Binding of transfer ribonucleic acid to ribosomes engaged in protein synthesis: number and properties of ribosomal binding sites // *J. Mol. Biol.*—1965.—11, N 1.— P. 35—53.
7. *Semenov Yu. P., Kirillov S. V., Stahl I.* 40S subunits from rat liver ribosomes do contain two codon-dependent sites for transfer RNA // *FEBS Lett.*—1985.—193, N 1.— P. 105—108.
8. *Falvey A. K., Staechelin T.* Structure and function of mammalian ribosomes. 1. Isolation and characterization of active liver ribosomal subunits // *J. Mol. Biol.*—1970.—53, N 1.— P. 1—19.
9. *Семенов Ю. П., Макаров Е. М., Кириллов С. В.* Количественное изучение взаимодействия деацелированной тРНК с Р, А и Е сайтами 70S рибосом *E. coli* // *Биополимеры и клетка.*—1985.—1, № 4.— С. 183—194.

10. 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.
11. 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.
12. Kirillov S. V., Semenov Yu. P. Non-exclusion principle of AcPhe-tRNA interaction with the donor and acceptor sites of *Escherichia coli* ribosomes // FEBS Lett.—1982.—148, N 2.—P. 235—238.
13. Peters M., Yarus M. Transfer RNA selection at the ribosomal A and P sites // J. Mol. Biol.—1979.—134, N 3.—P. 471—491.
14. Non-acylated tRNA binding on rat liver 60S subunits / M. Buisson, A.-M. Reboud, S. Dubost, J. P. Reboud // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1979.—90, N 2.—P. 634—640.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ленингр. ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова, Гатчина

Получено 10.11.86

УДК 577.217.532+577.18.02

БЕСФАКТОРНЫЙ ПОЛИ(dT)-ЗАВИСИМЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОФЕНИЛАЛАНИНА НА 70S РИБОСОМАХ ESCHERICHIA COLI

К. А. Солдаткин, А. П. Потапов, А. В. Ельская

В рамках проверки гипотезы о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов, постулирующей прямое взаимодействие некоторого участка декодирующего центра рибосомы с сахаро-фосфатным остовом кодон-антикодонных дуплетов [1, 2], нами начато сравнительное изучение матричной активности поли(U) и ее дезоксирибоаналога, поли(dT), в трансляции. Один из этапов работы состоял в определении активности данных полинуклеотидов в бесфакторном кодонзависимом связывании Phe-tРНК^{Phe} на 70S рибосомах *E. coli* в отсутствие и присутствии антибиотика неомидина, способного, как известно [3, 4], стимулировать трансляцию полидезоксирибонуклеотидных матриц в бесклеточных белоксинтезирующих системах.

Материалы и методы. 30S и 50S субчастицы рибосом *E. coli* MRE 600 любезно предоставлены В. И. Махино (ЛИЯФ им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина). Поли(U) фирмы «Reanal» (ВНР), поли(dT) — НИКТИ БАВ (Бердск), [¹⁴C]фенилаланин (13,3 ГБк/ммоль) производства ЧССР, неомидинсульфат фирмы «Boehringer» (ФРГ). Высокообогащенные (1400—1600 пмоль на 1 ед. A₂₆₀) [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} получали из дрожжей по [5]. Связывание [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} с 70S рибосомами проводили по [6] в присутствии 20 мМ трис-НСl, рН 7,6, 100 мМ NH₄Cl и 20 мМ MgCl₂. Разделение моно- и олигофенилаланинов проводили хроматографией на бумаге FN-15 в растворителе *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (78 : 5 : 17) [7].

Результаты и обсуждение. При изучении взаимодействия Phe-tРНК^{Phe} с поли(dT)-программированными 70S рибосомами в условиях бесфакторного связывания при 2°C был обнаружен аномально высокий уровень заполнения рибосом субстратом — количество остатков [¹⁴C]фенилаланина на рибосому равнялось четырём—пяти вместо обычных двух, соответствующих А- и Р-центрам. Из рис. 1 видно, что количество связанных с рибосомой остатков фенилаланина растёт во времени, причём при 37°C значительно быстрее, чем при 2°C. Но в присутствии антибиотика неомидина, а также на поли(U)-программированных рибосомах связывается не более двух молекул Phe-tРНК^{Phe}. Наблюдающееся при длительных инкубациях снижение уровня связывания Phe-tРНК^{Phe} с [поли(U)·70S] при 37°C, по-видимому, объясняется десорбцией тРНК с рибосом с последующим их деацилированием: в тех же условиях за 70 мин инкубации деацилировалось 65—70 % Phe-tРНК^{Phe} (данные не приведены). Комплексы с участием поли(dT) были стабильными.

Поскольку наиболее вероятной причиной аномального увеличения количества связанного с рибосомой в присутствии поли(dT) радиоактивного материала может быть трансляция, был проведен хроматографический анализ меченых продуктов после деацилирования тРНК (0,16 М КОН, 30 мин, 37°C) в условиях разделения моно-, ди- и трифенилаланина. Оказалось (рис. 2), что в системе, содержащей [поли(dT)·70S], обра-