

- midate / B. Golenska, R. Millon, C. Backendorf et al. // *Ibid.*—1981.—115, N 3.— P. 479—484.
18. *Cross-linking* between 16S ribosomal RNA and protein S4 in *Escherichia coli* ribosomal 30S subunits effected by treatment with bisulfite/hydrazine and bromopyruvate / N. Nitta, O. Kuge, S. Yui et al. // *Ibid.*—1986.—157, N 3.— P. 427—432.
19. Stöffler G., Stöffler-Meilicke M. Immuno electron microscopy on *Escherichia coli* ribosomes // Structure, function, and genetics of ribosomes / Eds B. Hardesty, G. Kramer.— New York: Springer, 1986.— P. 28—46.
20. *Ribosome* structure, function, and evolution: mapping ribosomal RNA, proteins, and functional sites in three dimensions / M. Oakes, E. Henderson, A. Scheinman et al. // *Ibid.*— P. 47—67.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отделения АН СССР,
Новосибирск

Получено 03.05.88

rRNA-PROTEIN INTERACTIONS IN *ESCHERICHIA COLI* 70S RIBOSOMES
AND IN COMPLEX OF INITIATION BY DATA OF CROSS-LINKS
WITH BIFUNCTIONAL Pt(II) DERIVATIVE

P. G. Chistyakov, M. Abdulkarimov, A. G. Venyaminova, S. N. Vladimirov,
D. M. Graifer, S. A. Kazakov, G. G. Karpova

Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

S u m m a r y

rRNA-protein cross-links in 70S ³⁵S-labelled ribosomes in the free state and within initiation complex ribosome·AUGU₆·fMet-tRNA^{fMet} were investigated using bifunctional cleavable reagent {dichloro[N,N,N',N'-tetrakis-(2-aminoethyl)-1,6-hexamethylenediamine-diplatinum(II)]dichloride. The sets of proteins cross-linked to 16S and 23S rRNA in free 70S ribosomes and in 70S initiation complex were shown to slightly differ. It was found that one of L7/L12 dimers borders on one of 16S rRNA sites (a distance ≲1,5 nm) both in free ribosomes and in initiation complex.

УДК 547.963.3

Д. Б. Дорохов, В. Б. Одинцов, С. В. Кириллов

МАТРИЧНОЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОЦИЛ-ТРНК
С А-УЧАСТКОМ 70S РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*
В ОТСУТСТВИЕ ТРАНСПЕПТИДАЦИИ

Измерены константы ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-участком 70S рибосом в условиях блокирования ее связывания с Р-участком деацилированной тРНК^{Phe}. По зависимости величины константы ассоциации от температуры рассчитаны энтальпия ($\Delta H^\circ \sim 11$ ккал/моль) и энтропия ($\Delta S^\circ \sim -5$ ккал·моль⁻¹·град⁻¹) этого взаимодействия. Константа ассоциации Phe-тРНК^{Phe}, измеренная при 0°C и блокировании Р-участка нерасцепляемым аналогом пептидил-тРНК, хорошо согласуется с этой зависимостью. Около двух ионов магния прямо или опосредованно принимают участие в матричнозависимом взаимодействии Phe-тРНК^{Phe} с А-участком 70S рибосом.

Введение. Получение количественных данных о взаимодействии аминоксил-тРНК с А-участком рибосомы представляет большой интерес, так как именно оно обеспечивает, по-видимому, точность отбора очередной аминоксилоты в процессе элонгации и, как следствие, высокую точность трансляции. Однако до настоящего времени не получено не только сравнительных физико-химических характеристик взаимодействия близких по кодовым свойствам аминоксил-тРНК с А-участком комплекса рибосома — матрица, но и не рассчитаны термодинамические параметры взаимодействия соответствующей кодону аминоксил-тРНК с А-участком в условиях равновесия. Трудность состоит в выборе системы для его измерения.

Ранее было показано, что Phe-тРНК^{Phe} обладает ббльшим сродством к Р-участку комплекса [70S+поли(U)], чем к А-участку, и при

повышении концентрации тРНК происходит последовательное заполнение сначала Р-, а потом А-участков 70S рибосомы с быстрым образованием diPhe [1—3]. Ясно, что условия неравновесны и исследовать термодинамику взаимодействия аминоксил-тРНК с А-участком невозможно. По-видимому, для такого исследования необходимо блокирование Р-участка лигандом, не дающим возможности системе выходить из равновесия посредством образования пептидной связи.

Попытка использовать в качестве субстрата Р-участка нерасщепляемый аналог пептидил-тРНК, а именно AcPhe-тРНК^{Phe}_{ox-red}, которая из-за особенностей своей структуры неспособна образовывать пептидной связи, не позволила измерить все термодинамические параметры взаимодействия Phe-тРНК с А-участком комплекса [70S+поли(U)+AcPhe-тРНК^{Phe}_{ox-red}], хотя и были получены некоторые физико-химические характеристики такого взаимодействия при 0 °С [4]. Система же с использованием другого нерасщепляемого аналога пептидил-тРНК, так называемой амидной тРНК, кажется нам бесперспективной для этих целей вследствие практически одинакового сродства этой тРНК к А- и Р-участкам рибосом.

Следует упомянуть еще работу Питерс и Яруса, в которой была предпринята попытка измерения термодинамических параметров связывания аналога аминоксил-тРНК — PheIac-тРНК^{Phe} — с А- и Р-участками 70S рибосомы в отсутствие факторов элонгации [5]. В этой работе в качестве специфического ингибитора связывания тРНК с Р-участком рибосомы применяли антибиотик эдеин. В присутствии эдеина авторы измерили константу диссоциации аминоксил-тРНК с рибосомой, считая, что связывание тРНК происходит с А-участком. Однако позже появилась работа, специально посвященная исследованию влияния эдеина на взаимодействие тРНК с рибосомой [6], где показано, что эдеин ингибирует связывание тРНК одновременно на А- и Р-участках рибосомы и, следовательно, не может применяться в качестве ингибитора только Р-участка.

Таким образом, из-за неучтенной специфики действия эдеина при дискриминации тРНК-связывающих участков рибосомы часть экспериментальных результатов и выводов работы Питерс и Яруса вызывает сомнение. Так, авторы на основании констант диссоциации PheIac-тРНК^{Phe} приходят к выводу, что сродство аминоксил-тРНК к А- и Р-участкам рибосом практически равно, что, как известно, противоречит целому ряду экспериментальных результатов [1—3].

В связи с вышесказанным в настоящей работе мы предприняли попытку измерения термодинамических параметров взаимодействия Phe-тРНК^{Phe} с А-участком 70S рибосом при Р-участке, заблокированном деацилированной тРНК.

Материалы и методы. 30S и 50S субчастицы рибосом выделяли из клеток *E. coli* MRE-600 по методике, описанной ранее [3]. Поли(U) фракционировали после щелочного гидролиза на колонке сефадекса G-100, как описано в [7], и в работе использовали фракцию со средней молекулярной массой около 30000.

Препараты [³H]Phe-тРНК^{Phe} и [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} после аминоксиллирования обогащали на БД-целлюлозе, как описано в [8]. Степень обогащения составляла 1400+1500 пмоль/ед. А₂₆₀. Равномерно меченную [¹⁴C]урацилом тРНК выделяли из клеток *E. coli* AT 2473, дефектных по синтезу урацила [9], и обогащали до содержания 1500 пмоль Phe-тРНК^{Phe} на БД-целлюлозе [8]. После деацилирования при pH 9,0 и 37 °С в течение 1 ч препарат равномерно меченной [¹⁴C]тРНК^{Phe} трижды переосаждали этанолом, растворяли в воде и хранили в жидком азоте.

Эксперименты по определению количества образованного комплекса между тРНК и рибосомами проводили в стандартном буферном растворе (0,02 М трис, pH 7,4, 0,2 М NH₄Cl). Концентрация ионов магния и температура изменялись от эксперимента к эксперименту. В буфер добавляли ЭДТА и ионы магния при соотношении концентраций 1:0,05. Условия и детали проведения экспериментов даны в подписях к рисункам. Количество образованного комплекса определяли по радиоактивности, оставшейся после

филтрации инкубационной смеси через нитроцеллюлозные мембранные фильтры «Suprog» (ЧССР) с диаметром пор 0,4 мкм [10]. Для счета двойной радиоактивной метки $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ фильтры растворяли в 1 мл ацетона, добавляли 15 мл сцинтиллятора и считали на сцинтилляционном спектрометре «Beckman» 8501 (США).

Антибиотик тетрациклин («Serva», ФРГ) использовали при его конечной концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Результаты и обсуждение. Для изучения равновесного взаимодействия аминоксил-тРНК с А-участком рибосом в отсутствие транспептидации необходимо надежно блокировать ее взаимодействие с Р-сайтом. При выбранной нами концентрации ионов магния (10 мМ) можно достаточно эффективно реализовывать как *EF-Tu*-зависимое, так и бесфакторное взаимодействие аминоксил-тРНК с А-участком рибосом. В то же время в этих условиях средство деацилированной тРНК к Р-

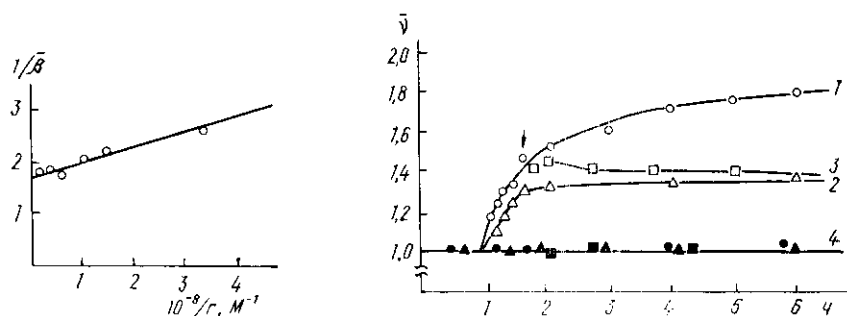


Рис. 1. Изотерма адсорбции $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ на Р-участке комплекса $[70\text{S}+\text{поли}(\text{U})]$. Инкубационные смеси различного объема (от 0,1 до 4 мл) содержали в стандартном буферном растворе при 10 мМ MgCl_2 10 пмоль 70S, 5 мкг поли(U) и 6,3 пмоля $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$. Время инкубации 1 ч при 23°C

Fig. 1. The adsorption isotherm of $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ to P-site of $[70\text{S}+\text{poly}(\text{U})]$ complex. Incubation mixtures of different volumes (0.1-4 ml) contained 10 pmol of 70S, 5 μg of poly(U) and 6.3 pmol of $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ in standard buffer solution (with 10 mM MgCl_2). The incubation time was 1 h at 23°C

Рис. 2. Кинетики ассоциации и диссоциации $[^3\text{H}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ на А-участке 70S рибосомы при 17°C. Инкубационная смесь объемом 0,1 мл в стандартном буферном растворе при 10 мМ MgCl_2 содержала 6 пмоль 70S, 3 мкг поли(U), 20 пмоль $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$, 24 пмоля $[^3\text{H}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ (1) и 50 пмоль немеченой $t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ (2). Для изотопного разбавления в инкубационную смесь добавляли 50 пмоль немеченой $t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ после 1 ч инкубации (3). Значение \bar{v} для $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ (4) контролировали во всех случаях и обозначали соответствующими открытыми символами

Fig. 2. Kinetics of association and dissociation of $[^3\text{H}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ to A-site of 70S ribosome at 17°C. The incubation mixture in a volume of 0.1 ml in standard buffer solution (with 10 mM MgCl_2) contained 6 pmol of 70S, 3 μg of poly(U), 20 pmol of $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$, 24 pmol of $[^3\text{H}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ (1) and 50 pmol of unlabelled $t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ (2). After 1 h of incubation for isotopic dilution 50 pmol of unlabelled $t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ was added in the incubation mixture (3). The \bar{v} value for $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ (4) was controlled in all the cases and marked with corresponding symbols

участку как минимум на порядок выше [8], что является залогом надежного экранирования Р-участка деацилированной тРНК.

На рис. 1 представлена изотерма адсорбции $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$ на Р-участке комплекса $[70\text{S}+\text{поли}(\text{U})]$. Измерения проводили методом переменного объема [4]. Определенная из этого эксперимента величина константы ассоциации ($6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) хорошо согласуется с величинами, полученными ранее [8] для данных условий эксперимента. Антибиотик тетрациклин, специфический ингибитор А-участка, на это взаимодействие не влиял. Доля $[^{14}\text{C}]t\text{RNA}^{\text{Phe}}$, активной во взаимодействии с Р-участком рибосом, определенная из этого эксперимента, составила 57% и учитывалась в дальнейшем.

Зная долю активной тРНК и равновесную константу ассоциации, мы можем создать такую ее концентрацию, что величина \bar{v} (среднее ко-

личество молекул тРНК на рибосому) будет равна 1. Если для деацелированной тРНК $\nu \geq 1$, то связывание аминоксил-тРНК будет происходить только с А-участком. Это может отразиться на доле рибосом, активных в связывании аминоксил-тРНК, но не на величине константы. Если же для деацелированной тРНК $\bar{\nu} < 1$, то связывание аминоксил-тРНК будет происходить с вакантными Р- и А-участками рибосом, что скажется не только на доле активных рибосом, но и на величине константы ассоциации аминоксил-тРНК.

Все дальнейшие эксперименты проводили в две стадии.

1. Формировали комплекс [70S+поли(U)] и к нему добавляли $[^{14}\text{C}]$ тРНК^{Phe} в количестве, необходимом для связывания только одной (или чуть более) молекулы тРНК и инкубировали в течение 1 ч. При этом реализуется связывание только с Р-участком. В течение этого времени достигается равновесие [8].

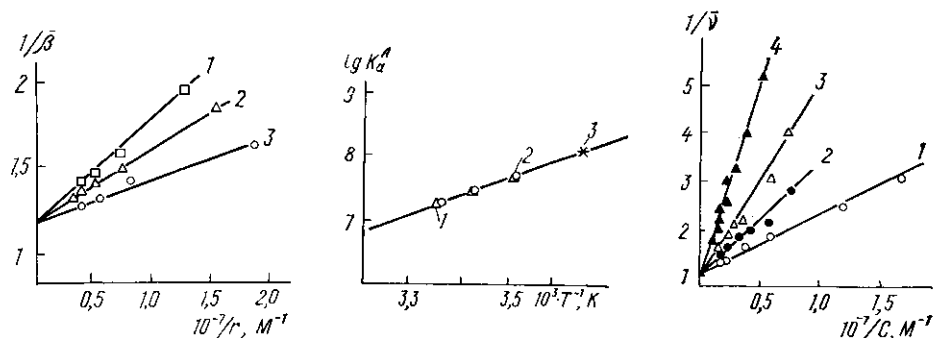


Рис. 3. Изотерма адсорбции $[^3\text{H}]$ Phe-тРНК^{Phe} на А-участке комплекса [70S+поли(U)+ $[^{14}\text{C}]$ тРНК^{Phe}] при различных температурах представлена в виде зависимости $1/\bar{\beta}$ от $1/r$: 1—25; 2—17; 3—11 °C. Инкубационные смеси объемом 0,1 мл при указанной температуре в стандартном буферном растворе при 10 мМ MgCl_2 содержали 5,1 пмоль $[^3\text{H}]$ Phe-тРНК^{Phe} и переменное количество комплекса [70S+поли(U)+ $[^{14}\text{C}]$ тРНК^{Phe}] (концентрация комплекса в пробе $(0,8-3,3) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Время инкубации 3 ч

Fig. 3. The adsorption isotherms of $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe} to A-site of [70S+poly(U)+ $[^{14}\text{C}]$ tRNA^{Phe}] complex at different temperatures was presented as $1/\bar{\beta}$ vs $1/r$ plot: 1—25; 2—17; 3—11 °C. The incubation mixtures in volume of 0.1 ml in the standard buffer (with 10 mM MgCl_2) at the corresponding temperature contained 5.1 pmol $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe} and variable amount of [70S+poly(U)+ $[^{14}\text{C}]$ tRNA^{Phe}] complex concentration $(0.8 \text{ to } 3.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1})$. The incubation time is 3 h

Рис. 4. Зависимость Вант-Гоффа для Phe-тРНК^{Phe} на А-участке комплекса [70S+поли(U)+тРНК^{Phe}] при 10 мМ MgCl_2 . Показаны значения константы ассоциации, рассчитанные на основании результатов экспериментов, проведенных различными методами: 1 — из зависимости $1/\bar{\beta}$ от $1/r$; 2 — из зависимости $1/\bar{\nu}$ от $1/C$; 3 — K^A_0 при 0 °C, определенная экстраполяцией

Fig. 4. Vant-Hoff plot for binding of Phe-tRNA^{Phe} to A-site of [70S+poly(U)+tRNA^{Phe}] complex at 10 mM MgCl_2 . Association constant values calculated on the basis of results from experiments carried out by different methods are shown: 1 — from $1/\bar{\beta}$ vs $1/r$ plot; 2 — from $1/\bar{\nu}$ vs $1/C$ plot; 3 — K^A_0 at 0 °C determined by extrapolation

Рис. 5. Изотермы адсорбции $[^3\text{H}]$ Phe-тРНК^{Phe} на А-участке комплекса [70S+поли(U)+ $[^{14}\text{C}]$ тРНК^{Phe}] при различных концентрациях ионов магния: 1—20; 2—18; 3—14; 4—10 мМ. Инкубационные смеси объемом 0,1 мл при 24 °C в стандартном буферном растворе при различных концентрациях MgCl_2 содержали 10 пмоль 70S, 5 мкг поли(U), переменное количество $[^3\text{H}]$ Phe-тРНК^{Phe} и в зависимости от концентрации MgCl_2 различное количество $[^{14}\text{C}]$ тРНК^{Phe}: 18 пмоль при 20, 20 пмоль при 18, 25 пмоль при 14 и 30 пмоль при 10 мМ MgCl_2 . Время инкубации после внесения $[^3\text{H}]$ Phe-тРНК^{Phe} 3 ч

Fig. 5. The adsorption isotherm of $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe} to A-site of [70S+poly(U)+ $[^{14}\text{C}]$ tRNA^{Phe}] complex with different concentrations of magnesium ions: 1—20; 2—18; 3—14; 4—10 mM. Incubation mixtures in a volume of 0.1 ml at 24 °C in standard buffer solution with different MgCl_2 concentrations contained 10 pmol of 70S, 5 μg of poly(U), variable quantity of $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe} and dependence of different quantity of $[^{14}\text{C}]$ tRNA^{Phe} on MgCl_2 concentration: 18 pmol at 20 mM MgCl_2 ; 25 pmol at 14 mM MgCl_2 ; 30 pmol at 10 mM MgCl_2 . The incubation time after addition of $[^3\text{H}]$ Phe-tRNA^{Phe} was 3 h

2. После формирования комплекса [70S+поли(U)+тРНК^{Phe}] в инкубационную смесь вносили [³H]Phe-тРНК^{Phe} и изучали взаимодействие с рибосомами.

На рис. 2 приведены результаты измерения кинетик взаимодействия Phe-тРНК^{Phe} с комплексом [70S+поли(U)+[¹⁴C]тРНК^{Phe}]. Это взаимодействие обратимо, так как при изотопном разбавлении [³H]Phe-тРНК^{Phe} немеченой Phe-тРНК^{Phe} уровень конечного связывания при прямой (ассоциация) и

Величины констант ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-участком комплекса [70S+поли(U)+тРНК^{Phe}] при 10 мМ MgCl₂ и различных температурах

Values of association constant of Phe-tRNA^{Phe} with A-site of the [70S+poly(U)+tRNA^{Phe}] complex at 10 mM MgCl₂ and different temperatures

$K_a^A \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$			Метод измерения
11 °C	17 °C	25 °C	
4,6±0,7	2,2±0,4	1,7±0,2	1/ \bar{v} от 1/r
5,0±0,6	2,6±0,3	1,7±0,2	1/v от 1/C

обратной (изотопный обмен) реакции стремится к одной и той же величине (рис. 2, кривые 2 и 3). Следует отметить также, что процесс связывания аминоксил-тРНК медленный (около 3 ч). На протяжении всего эксперимента уровень связывания деацелированной [¹⁴C]тРНК^{Phe} остается постоянным ($\bar{v}=1$) (рис. 2, кривая 4). Более того, тетрациклин в концентрации 5×10^{-5} М полностью ингибирует взаимодействие Phe-тРНК^{Phe} с комплексом [70S+поли(U)+[¹⁴C]тРНК^{Phe}]. Таким образом, мы имеем дело с обратимым взаимодействием Phe-тРНК^{Phe} с А-участком комплекса [70S+поли(U)+[¹⁴C]тРНК^{Phe}].

Изотермы адсорбции Phe-тРНК^{Phe} на А-участке комплекса [70S+поли(U)+[¹⁴C]тРНК^{Phe}] были исследованы методом, сходным с методом переменного объема. Фиксированное количество [³H]Phe-тРНК^{Phe} титровали увеличивающимися концентрациями комплекса [70S+поли(U)+[¹⁴C]тРНК^{Phe}], при этом следили за долей связанной деацелированной тРНК, величина \bar{v} для которой не менялась и была равна 1. Результаты приведены в виде зависимости 1/ \bar{v} от 1/r на рис. 3 (\bar{v} — доля связанной Phe-тРНК^{Phe}, r — концентрация свободного комплекса [70S+поли(U)+тРНК^{Phe}]) и на их основании показано, что доля Phe-тРНК^{Phe}, активной в связывании с А-участком рибосом, составляет 74 % (в дальнейшем это учитывалось при расчете константы ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-участком комплекса). Величины констант приведены в таблице.

Константа ассоциации при равновесии не должна зависеть от того, что мы в конкретном эксперименте считали сорбентом, а что — сорбатом. Другими словами, если мы снимем зависимость \bar{v} (средняя доля А-участков, занятых Phe-тРНК^{Phe}) от C (концентрация свободной Phe-тРНК^{Phe}), величины констант должны совпадать. Действительно, когда фиксированное количество комплекса [70S+поли(U)+[¹⁴C]тРНК^{Phe}] (величина \bar{v} для [¹⁴C]тРНК^{Phe}=1,1±0,1) титровали увеличивающимися концентрациями [³H]Phe-тРНК^{Phe}, величины констант ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-участком комплекса, рассчитанные из изотерм адсорбции Ленгмюра, в пределах ошибки совпали с полученными ранее, и их величины также приведены в таблице.

Таким образом, нам удалось измерить величины констант ассоциации аминоксил-тРНК с А-участком рибосом в отсутствие транспептидации при различных температурах.

Зная зависимость величины констант ассоциации от температуры, можно рассчитать термодинамические параметры взаимодействия согласно уравнениям:

$$\Delta H^0 = -R \frac{d \ln K_a^A}{d(1/T)}; \quad \Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T},$$

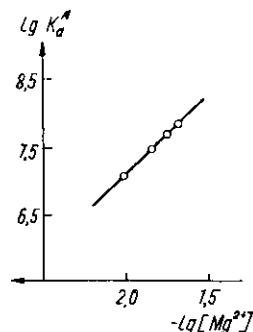
где ΔG^0 — изменение стандартной свободной энергии; R — универсаль-

ная газовая постоянная; T — абсолютная температура; K_a^A — константа ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-участком рибосом; ΔH^0 , ΔS^0 — соответственно изменения энтальпии и энтропии.

На рис. 4 представлена зависимость $\lg K_a^A$ от $1/T$ для взаимодействия Phe-тРНК^{Phe} с А-участком комплекса [70S+поли(U)+тРНК^{Phe}]. Рассчитанная величина $K_a^A 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ практически совпадает с величиной константы ассоциации, измеренной в экспериментальной системе, где в качестве лиганда Р-участка использовали нерасщепляемый аналог пептидил-тРНК, AcPhe-тРНК^{Phe}_{кох-ред} [4]. Такое совпадение свидетельствует о том, что термодинамические параметры взаимодействия Phe-тРНК^{Phe} с А-участком рибосом ($\Delta H^0 = 11 \pm 3$ ккал/моль; $\Delta S^0 =$

Рис. 6. Зависимость $\lg K_a^A$ для связывания Phe-тРНК^{Phe} на А-участке комплекса [70S+поли(U)+тРНК^{Phe}] от $\lg[Mg^{2+}]$. Построена на основании экспериментальных данных, представленных на рис. 5

Fig. 6. The $\lg K_a^A$ vs $\lg Mg^{2+}$ plot for binding of Phe-tRNA^{Phe} to A-site of [70S+poly(U)+tRNA^{Phe}] complex was constructed on the basis of experimental data from Fig. 5



$= - (5 \pm 0,5 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{град}^{-1})$, рассчитанные из экспериментов в данной системе, можно, по-видимому, перенести в экспериментальную систему, где участок блокируется аналогом пептидил-тРНК.

Важной характеристикой взаимодействия тРНК с участком рибосом является количество ионов магния, прямо или опосредованно принимающих участие в этом взаимодействии. Для прояснения этого вопроса мы сняли изотермы адсорбции Phe-тРНК^{Phe} с комплексом [70S+поли(U)+тРНК^{Phe}] при постоянной температуре и различных концентрациях ионов магния. Рассчитанные из них константы поли(U)-зависимой ассоциации Phe-тРНК^{Phe} с А-участком 70S рибосом при различных концентрациях соли и $t^0 24^\circ \text{C}$ представлены ниже:

$[Mg^{2+}]$, мМ	10	14	18	20
$K_a^A \cdot 10^{-7}$, M^{-1}	$1,6 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,4$	$5 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,7$

Изотермы адсорбции получали титрованием фиксированного количества комплекса [70S+поли(U)+¹⁴C]тРНК^{Phe} различным количеством [³H]Phe-тРНК^{Phe}. Рис. 5 иллюстрирует зависимости $1/\bar{v}$ от $1/C$. Уровень связывания [¹⁴C]радиоактивности оставался постоянным во время всего эксперимента ($\bar{v} = 1$).

На рис. 6 приведена логарифмическая зависимость констант ассоциации от логарифма концентрации ионов магния. Она линейна и подчиняется уравнению: $\Delta \lg K_a^A = n \Delta \lg [Mg^{2+}]$.

В этом случае величина может быть интерпретирована как количество ионов магния, прямо или опосредованно участвующих во взаимодействии [8, 11, 12]. Величина n в данном случае составляет $2,1 \pm 0,2$, а линейность зависимости позволяет находить экстраполяцией величины констант ассоциации в областях концентраций ионов Mg^{2+} , где прямые измерения затруднены из-за очень высокого или очень низкого сродства Phe-тРНК^{Phe} к А-участку 70S рибосом. Отсутствие отклонения зависимости от прямой свидетельствует о том, что концентрация ионов $[Mg^{2+}]$ имеет чисто количественное влияние на величину константы ассоциации.

Таким образом, используя деацелированную тРНК в качестве ингибитора связывания аминоксил-тРНК на Р-участке, нам удалось определить термодинамические параметры взаимодействия аминоксил-тРНК и показать, что, по-видимому, и при ингибировании связывания аминоксил-тРНК на Р-участке нерасщепляемым аналогом пептидил-

тРНК эти параметры должны быть близки. При взаимодействии аминоксил-тРНК с А-участком 70S рибосом принимают участие два иона магния, прямо и опосредованно. Этим взаимодействием аминоксил-тРНК с А-участком 70S рибосом отличается от такового с малой 30S субчастицей, которое практически не зависит от ионов Mg^{2+} [12] и от взаимодействия аминоксил-тРНК с Р-участком [70S+поли(U)]-комплекса, сильно зависящего от $[Mg^{2+}]$ [8].

Авторы выражают благодарность В. И. Махно за предоставленные препараты рибосом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах. Взаимодействие аминоксил-тРНК с 70S рибосомами *Escherichia coli* в отсутствие фактора элонгации *EF-Tu* и ГТФ / К. Ш. Кемхадзе, В. Б. Одинцов, В. И. Махно и др. // Молекуляр. биология. — 1981.—15, № 4.— С. 779—789.
2. 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 4.— P. 221—224.
3. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov 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. Quantitative study of the interaction of aminoacyl-tRNA with the A-site of *Escherichia coli* ribosomes. Equilibrium and kinetics parameters of binding in the absence of *EF-Tu* factor and GTP / K. Sh. Kemkhadze, V. B. Odintsov, V. I. Makhno et al. // FEBS Lett.—1981.—125, N 1.— P. 10—14.
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. Особенности влияния антибиотика эдеина на взаимодействие тРНК с участком А, Р и Е 70S рибосом *Escherichia coli* / Ю. П. Семенов, В. И. Махно, Е. М. Макаров, С. В. Кириллов // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.— С. 1348—1351.
7. 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. Makhno, S. V. Kirillov // Nucl. Acids Res.—1980.—8, N 2.— P. 403—421.
8. Семенов Ю. П., Макаров Е. М., Кириллов С. В. Количественное изучение взаимодействия деацелированной тРНК с Р-, А- и Е-сайтами 70S рибосомы *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—1985.—1, № 4.— С. 183—193.
9. Grajevskaya 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. 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. Odintsov, Yu. P. Semenov // Ibid.—1978.—89, N 3.— P. 305—313.
11. Кириллов С. В. Механизм кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомах // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1983.— С. 5—98.— (Биол. химия; Т. 18).
12. Как участки связывания рибосомы различают функциональные формы тРНК? / Е. М. Макаров, В. И. Катунин, В. Б. Одинцов и др. // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.— С. 1342—1347.

Ленингр. ин-т ядер. физики
им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина
Ин-т эколог. генетики АН МССР, Кишинев

Получено 12.01.88

TEMPLATE-DEPENDENT BINDING OF AMINOACYL-tRNA TO THE A-SITE OF *ESCHERICHIA COLI* 70S RIBOSOMES IN THE ABSENCE OF TRANSPEPTIDATION

D. B. Dorokhov, V. B. Odintsov, S. V. Kirillov

V. P. Konstantinov Nuclear Physics Institute,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Gatchina
Institute of Ecological Genetics,
Academy of Sciences of the Moldavian SSR, Kishinev

Summary

The equilibrium binding constants of Phe-tRNA^{Phe} to A-site of *Escherichia coli* ribosomes were measured when the P-site was initially preoccupied by tRNA^{Phe}. The temperature dependence of association constant values has permitted calculating enthalpy

($\Delta H^\circ \sim 11$ kcal/mol) and entropy $\Delta S^\circ \sim -5$ cal·mol⁻¹·degree⁻¹. Association constant of Phe-tRNA^{Phe} measured at 0°C and during blocking of P-site with a unsplitable analog of peptidyl-tRNA is in good agreement with that dependence.

УДК 577.217:357.32

Л. Л. Иванов, З. П. Мартинкус, Р. Р. Стапуленис, Л. Ю. Лукошявичюс,
А. В. Лекис

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕЙЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В БЕЗРИБОСОМНЫХ ЭКСТРАКТАХ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА И МИОКАРДА СВИНЬИ

Изучено распределение лейцил-тРНК синтетазной активности в безрибосомных экстрактах печени кролика и миокарда свиньи. При ишемии миокарда в обоих исследованных экстрактах отмечено частичное перераспределение активности этого фермента между фракциями различной молекулярной массы. Высказывается предположение о том, что процессы ассоциации — диссоциации аминоксил-тРНК синтетаз могут участвовать в регуляции скорости белкового синтеза в эукариотических клетках.

Введение. Известно, что эукариотические аминоксил-тРНК синтетазы (АРСазы) в отличие от прокариотических ферментов функционируют в составе высокомолекулярных комплексов [1, 2], образуют ассоциаты с рибосомами и микросомами [3—5], обладают высоким сродством к высокомолекулярной РНК [3—6]. Предполагается, что эти эволюционно приобретенные свойства АРСаз необходимы для их частичной компартиментализации в клетке в местах функционирования [4, 5]. Кроме того, в последние годы установлено, что при некоторых физиологических и патологических изменениях в организме, приводящих к нарушению биосинтеза белка, имеет место разнонаправленное перераспределение АРСаз между комплексами различной молекулярной массы либо между комплексами и фракцией свободных ферментов [7—12].

В данной работе проведено изучение распределения лейцил-тРНК синтетазной активности в безрибосомных экстрактах печени кролика и миокарда свиньи в норме и на модели нарушения биосинтеза белка — экспериментальном инфаркте миокарда кролика (ЭИМ) и тотальной ишемии миокарда свиньи, которые, как мы установили ранее, сопровождаются изменением активности компонентов аппарата трансляции [13—15].

Материалы и методы. Методики воспроизведения ЭИМ у кролика и тотальной ишемии миокарда свиньи описаны в работах [14, 16].

Получение безрибосомных экстрактов. Ткань печени либо миокарда гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в двух объемах буфера А (20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 30 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 250 мМ сахароза, 0,1 мМ дитиотреитол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Гомогенат центрифугировали 15 мин при 27000 *g* и 90 мин при 105000 *g* и отбирали надосадочную жидкость (безрибосомный экстракт).

Хроматография на сефарозе 6В. 4 мл безрибосомного экстракта наносили на колонку с сефарозой 6В («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) (16××750 мм), уравновешенную буфером А. Элюцию проводили тем же буфером. Объем фракций — 3 мл, скорость элюции 10 мл/ч.

Молекулярную массу полученных белковых фракций определяли по калибровочной кривой, используя маркеры со следующей молекулярной массой: альдолаза — 158000, каталаза — 232000, ферритин — 440000, тироглобулин — 669000, декстран голубой — 2000000.

Активность лейцил-тРНК синтетазы (лейРС) определяли по начальной скорости реакции аминокислотирования тРНК при насыщающих концентрациях субстратов. Реак-