

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИ(U)- И ПОЛИ(dT)-ЗАВИСИМОГО СВЯЗЫВАНИЯ Phe-tPНК^{Phe} С 30S СУБЧАСТИЦАМИ РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*

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

Введение. В рамках проверки гипотезы о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонного комплекса, постулирующей прямое взаимодействие некоторого участка декодирующего центра рибосомы с сахаро-фосфатным остовом кодон-антикодонных дуплексов [1, 2], нами показана существенно различная матричная активность поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *E. coli* и зародышей пшеницы [3]. Согласно этим и литературным данным [4, 5], система трансляции весьма чувствительна к структуре сахарных остатков матриц. Антибиотик неомицин способен разблокировать трансляцию однопептидной ДНК [4—6], причем параллельно он ингибирует трансляцию РНК, т.е. изменяет компетенцию системы по механизму «либo-рибо-, либо дезоксирибонуклеиновые матрицы» [3]. При этом неомицин действует на матричнозависимые этапы трансляции, не затрагивая транслептидации [3]. Есть указания на то, что он ингибирует транслокацию [7]. С другой стороны, метилированные по 2'-ОН-группам, и полидезоксинуклеотидные матрицы малоактивны в кодонзависимом связывании аминоксил-тРНК на рибосомах [8, 9], и неомицин, возможно, способен стимулировать их матричную активность [4]. Но приведенные в этих работах данные чисто качественного характера и противоречивы.

Задачей данной работы было изучение матричной активности аутентичных матриц поли(U) и поли(dT) и влияния на эту активность неомицина в системе кодонзависимого связывания Phe-tPНК^{Phe} на 30S субчастицах рибосом *E. coli*.

Материалы и методы. 30S субчастицы рибосом *E. coli* MRE-600 любезно предоставлены В. И. Махио (ЛИЯФ им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина). Поли(U) фирмы «Reanal» (Венгрия), поли(dT) производства НИКТИ БАВ (Бердск), [¹⁴C]фенилаланин (13,3 ГБк/ммоль) производства ЧССР, неомицин сульфат фирмы «Boehringer» (ФРГ).

Получение [¹⁴C]Phe-tPНК^{Phe}. Суммарный препарат тРНК получали из дрожжей по [10]. Препарат суммарных аминоксил-тРНК синтетаз из дрожжей получали по [11], используя гомогенизацию клеток с помощью ультразвука. [¹⁴C]Phe-tPНК^{Phe} получали по [12] с помощью двух хроматографий на БД-целлюлозе (в деацелированной, затем аминоксиллированной формах).

Связывание [¹⁴C]Phe-tPНК^{Phe} с 30S субчастицами рибосом. Инкубационная смесь (50 мкл) содержала: 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 100 мМ NH₄Cl, 20 мМ MgCl₂, 5—10 пмоль 30S субчастиц, 5 мкг поли(U) или 3 мкг поли(dT), различные количества [¹⁴C]Phe-tPНК^{Phe} (см. подписи к рисункам). Температура инкубации 2°C. Количество связанной [¹⁴C]Phe-tPНК^{Phe} определяли с помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах «Synpro» № 6 (ЧССР) по Ниренбергу и Ледеру [9]. Константы ассоциации определяли, как описано в [13].

Результаты и обсуждение. Предварительные опыты с использованием Phe-tPНК в составе суммарного препарата выявили качественный характер действия неомицина: антибиотик ингибировал поли(U)-зависимое связывание Phe-tPНК с 30S субчастицами и стимулировал поли(dT)-зависимое, что коррелирует с его влиянием на систему трансляции данных матриц [3].

Для изучения количественных характеристик связывания с 30S субчастицами использовали высокоочищенные [¹⁴C]Phe-tPНК^{Phe} (1600 пмоль/ед. A₂₆₀). В этой системе неомицин не влияет заметно ни на кинетику, ни на константы ассоциации Phe-tPНК^{Phe} с поли(U)-програм-

мированными 30S субчастицами, причем в обоих центрах (рис. 1, таблица).

Для объяснения различий в действии неомицина в системах кодон-зависимого связывания с использованием обогащенных и необогащенных Phe-тРНК^{Phe} была смоделирована ситуация, имеющая место при использовании Phe-тРНК в составе суммарной тРНК. Для этого в систему связывания вводили насыщающие количества суммарной деацелированной тРНК^{-Phe} (тРНК, выходящей в солевом градиенте при хро-

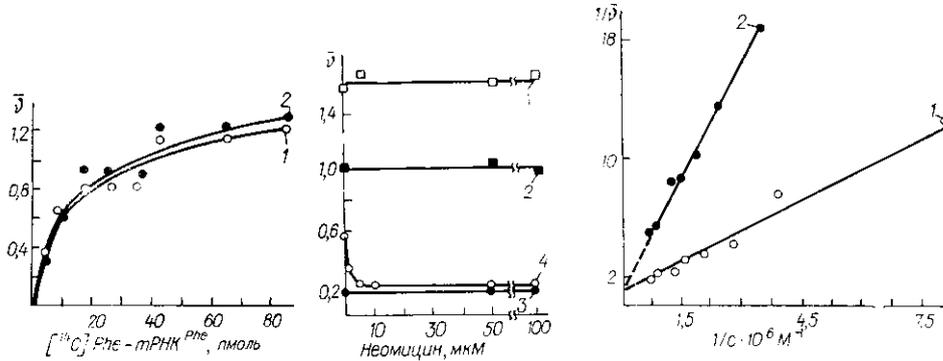


Рис. 1. Титрование комплекса [30S + поли(U)] [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} в отсутствие (1) и присутствии (2) 0,1 мМ неомицина. \bar{v} — количество молекул Phe-тРНК^{Phe}, связанных с одной 30S субчастицей. Пробы содержали 8 пмоль 30S субчастиц

Fig. 1. Concentration dependence of [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} adsorption on [30S + poly(U)] complex in the absence (1) and the presence (2) of 0.1 mM neomycin. \bar{v} — the actual fraction of ribosomes coupled with one 30S subunit. Samples contained 8 pmol of 30S subunits

Рис. 2. Зависимость связывания [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} с комплексом [30S + поли(U)] от концентрации неомицина в отсутствие (1) и присутствии (2) 10⁻⁴ М тетрациклина. В опыте с добавлением 4600 пмоль тРНК^{Phe} те же количества препаратов инкубировали в том же буфере с тетрациклином (3) и без (4). Пробы содержали 7 пмоль 30S субчастиц и 55 пмоль [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}

Fig. 2. Dependence of the [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} binding to the [30S + poly(U)] complex on neomycin concentration in the absence (1) and presence (2) of 10⁻⁴ M tetracycline. In the experiment with the addition of 4600 pmol of tRNA^{Phe} the same amounts of the preparations were incubated at the same buffer with (3) and without tetracycline (4). Samples contained 7 pmol of 30S subunits and 55 pmol of [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}

Рис. 3. Титрование А-центра комплекса [30S + поли(U)] [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} в отсутствие (1) и присутствии (2) 50 мкМ неомицина. Пробы содержали 7,5 пмоль 30S субчастиц и 4600 пмоль тРНК^{Phe}; c — концентрация свободной [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}

Fig. 3. Concentration dependence of [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} adsorption on [30S + poly(U)] complex in the absence (1) and presence (2) of 50 μ M neomycin. Samples contained 7.5 pmol of 30S subunits and 4600 pmol of tRNA^{Phe}; c — concentration of free [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe}

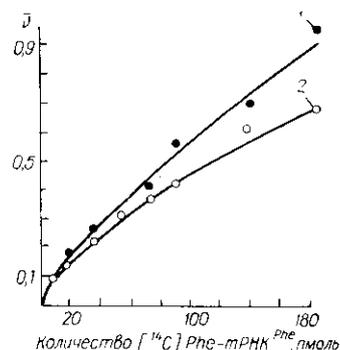
матографии на БД-целлюлозе). тРНК^{-Phe} эффективно ингибирует связыванием Phe-тРНК^{Phe} с Р-центром 70S рибосом [14], не занимая при этом А-центра. Из рис. 2 видно, что Phe-тРНК^{Phe} и в данной системе связывается в основном с А-центром поли(U)-программированной 30S субчастицы (тетрациклинчувствительное связывание). Неомицин угнетает это связывание (в отличие от системы без тРНК^{-Phe}), начиная уже с 10⁻⁶ М концентрации. Антибиотик понижает константу ассоциации Phe-тРНК^{Phe}, не изменяя числа мест связывания (рис. 3). Отсюда можно с определенностью заключить, что неомицин не выключает 30S субчастицы из процесса связывания Phe-тРНК^{Phe}.

Таким образом, действие неомицина на кодонзависимое связывание Phe-тРНК^{Phe} с А-центром поли(U)-программированной 30S субчастицы проявляется в зависимости от того, занят Р-центр кодонспецифической аминоксил-тРНК или кодоннеспецифической деацелированной тРНК, что, по-видимому, могло бы свидетельствовать об определенной кооперативности центров 30S субчастицы.

Система кодонзависимого связывания Phe-тРНК^{Phe} с 30S субчастицей с использованием кодоннеспецифической деацелированной тРНК является чисто модельной, так как в процессе трансляции на стадии элонгации имеет место ситуация, когда оба центра рибосомы заняты кодонспецифической аминоксил- или пептидил-тРНК. Следует напомнить, что неомицин на стадии элонгации блокирует поли(U)-зависимый синтез полифенилаланина [3]. Ближе к реальной система с очищенной Phe-тРНК^{Phe}, в которой эффект неомицина как раз не проявляется. Следовательно, влияние данного антибиотика на трансляцию поли(U) не может быть объяснено действием в системе связывания.

Рис. 4. Титрование комплекса [30S + поли(dT)] [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} в отсутствие (2) и присутствии (1) 10 мкМ неомицина. Пробы содержали 5,8 пмоля 30S субчастиц

Fig. 4. Concentration dependence of [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} adsorption on [30S + poly(dT)] complex without (2) and with (1) 10 μM neomycin. Samples contained 5.8 pmol of 30S subunits



Поли(dT) стимулирует связывание Phe-тРНК^{Phe} с 30S субчастицей (рис. 4). Это связывание практически не зависит от тетрациклина и, следовательно, происходит преимущественно в Р-центре. Константа ассоциации Phe-тРНК^{Phe} при этом приблизительно в 30 раз меньше соответствующей константы Р-центра поли(U)-программированной 30S субчастицы (таблица). Неомицин несколько стимулирует поли(dT)-зависимое связывание Phe-тРНК^{Phe} с субчастицей, причем, вероятно, за счет А-центра, так как имеет место заметное возрастание чувствительности к тетрациклину. Это в целом коррелирует со способностью неомицина разблокировать трансляцию поли(dT) [3, 5], хотя эффект и не настолько глубок. Как в отсутствие, так и присутствии антибиотика константы ассоциации относительно невелики (таблица). Добиться полного заполнения обоих центров поли(dT)-программированной 30S субчастицы не удалось даже при относительно высоких концентрациях Phe-тРНК^{Phe}.

Константы ассоциации (K_{as} , M^{-1}) Phe-тРНК^{Phe} с А и Р-центрами 30S субчастицы в присутствии поли(U) и поли(dT)

Binding of Phe-tRNA^{Phe} (K_{as} , M^{-1}) at the A and P site of 30S subunits in the presence of poly(U) or poly(dT)

Неомицин, М	тРНК ^{-Phe}	Поли(U)		Поли(dT)	
		А	Р	А	Р
—	—	$4 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$	$< 10^5$	$\sim 10^6$
10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4}	—	$4 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$	»	$\sim 10^6$
—	+	$7 \cdot 10^6$	—	»	—
$5 \cdot 10^{-5}$	+	$2 \cdot 10^5$	—	»	—

Таким образом, можно сделать вывод о существенно различной матричной активности поли(U) и поли(dT), отличающихся по структуре сахаров, в системе кодонзависимого связывания Phe-тРНК^{Phe} с 30S субчастицами рибосом, что коррелирует с данными по трансляции [3]. С другой стороны, эффект действия неомицина на трансляцию данных матриц, по всей вероятности, не может быть объяснен влиянием на кодонзависимое связывание Phe-тРНК^{Phe} с 30S субчастицами рибосом. С учетом отсутствия влияния неомицина на транслептидацию [3] высо-

кая чувствительность системы трансляции к антибиотику, по-видимому, в значительной мере определяется этапом транслокации.

Авторы благодарят В. И. Махно, С. В. Кириллова и А. П. Сургучева за содействие в выполнении данной работы.

STUDY OF poly(U) AND poly(dT)-DEPENDENT Phe-tRNA^{Phe} BINDING TO 30S SUBUNITS OF ESCHERICHIA COLI RIBOSOMES

K. A. Soldatkin, A. P. Potapov, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

To study the role of the codon sugar-phosphate backbones in the mRNA decoding process we have compared the messenger activity of authentic ribo- and deoxyribopolynucleotides, poly(U) and poly(dT), in the factor-free binding of Phe-tRNA^{Phe} to the 30S subunits of *E. coli* ribosomes. The template efficiency of poly(U) is much higher than that of poly(dT). Template 2'-hydroxyl groups seem to be important for the binding process at the A site of 30S subunit. The results obtained indicate the co-operative nature of the occupation of the P and A sites of 30S subunits. Neomycin exerted an insignificant effect upon the Phe-tRNA^{Phe} binding. High sensitivity of translation efficiency to neomycin may be due to the translocation stage.

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // FEBS Lett.—1982.—146, N 1.—P. 5—8.
2. Потанов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.—1985.—46, № 1.—С. 63—77.
3. Сравнительное изучение матричной активности поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *Escherichia coli* и зародышей пшеницы / А. П. Потанов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 3.—С. 133—138.
4. Morgan A. R., Wells R. D., Khorana N. G. Studies on polynucleotides. 74. Direct translation *in vitro* of single-stranded DNA-like polymers with repeating nucleotide sequences in the presence of neomycin B // J. Mol. Biol.—1967.—26, N 3.—P. 477—497.
5. Salas L., Bollum F. I. Biosynthetic polydeoxynucleotides as direct templates for polypeptide synthesis // J. Biol. Chem.—1968.—243, N 5.—P. 1012—1015.
6. McCarthy B. J., Holland J. J. Denaturated DNA as a direct template for *in vitro* protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1965.—54, N 3.—P. 880—886.
7. Cabanas M. J., Vazquez D., Modolle J. Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1978.—83, N 3.—P. 991—997.
8. Price A. R., Rottman F. 2'-O-methyloligoadenylates as templates for the binding of lysyl transfer ribonucleic acid to ribosomes // Biochemistry.—1970.—9, N 23.—P. 4524—4529.
9. Nirenberg M., Leder P. RNA codewords and protein synthesis // Science.—1964.—145, N 3639.—P. 1399—1407.
10. Zubay C. The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid // J. Mol. Biol.—1962.—4, N 3.—P. 347—356.
11. Keller E., Zamechnic P. The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labelled amino acids into proteins // J. Biol. Chem.—1956.—221, N 1.—P. 45—50.
12. Gillam I. C., Tener C. M. The use of BD-cellulose in separation of transfer RNA's // Meth. Enzymol.—1971.—20.—P. 55—70.
13. Кириллов С. В. Механизм кодон-антикодонового взаимодействия на рибосомах // Итоги науки и техники / Под ред. А. А. Красевского, В. Л. Кретовича.—М.: ВИНТИ, 1983.—С. 5—98 (Сер. «Биологическая химия». Т. 18).
14. 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 2.—P. 221—224.

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

Получено 16.07.86