

## THE THIRD SITE OF THE 70S RIBOSOME FOR AMINOACYL-tRNA ANALOGUE BINDING

*D. B. Dorokhov, S. B. Bourd, Yu. P. Semenov*

Department of Plant Genetics, Academy of Sciences  
of the Moldavian SSR, Kishinev;  
B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,  
Academy of Sciences of the USSR, Gatchina

### Summary

The interaction of the stable aminoacyl-tRNA analogue, tRNA<sup>Phe</sup>-C-C-A(3'NH)-Phe, with 70S ribosome is studied. It is shown that in the presence of poly(U) a ribosome can bind three molecules of tRNA<sup>Phe</sup>-C-C-A(3'NH)-Phe. The «additional» site for binding aminoacyl-tRNA analogue was shown to be similar to the ribosomal E-site for deacylate tRNA.

1. *Fraser T. H., Rich A.* Synthesis and aminoacylation of 3'-deoxytransfer RNA and its activity in ribosomal protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1973.—**70**, N 9.—P. 2671—2675.
2. *Sprinzi M., Wagner T.* Role of 2', 3' isomerization of aminoacyl-tRNA during ribosomal protein synthesis // Transfer RNA: structure, properties and recognition.—New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1979.—P. 12.
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. *Comparative study of the interaction of polyuridylic acid with 30S subunits and 70S ribosomes of Escherichia coli* / V. I. Katunin, Yu. P. Semcnkov, V. I. Makhno, S. V. Kirillov // Ibid.—1980.—**8**, N 2.—P. 403—421.
5. *Sprinzi M., Sternbach H.* Enzymatic modification of the C-C-A terminus // Meth. Enzymol.—1979.—**59**—P. 182—190.
6. *Rappaport H., Lapidot Y.* The chemical preparation of acetylaminoacyl-tRNA // Ibid.—1974.—**29 E.**—P. 685—693.
7. *Пешин Н. Н., Кириллов С. В.* Природа гетерогенности 30S рибосомных субчастиц *in vitro*. II. Два типа инактивации 30S субчастиц рибосом *Escherichia coli* // Молекуляр. биология.—1979.—**13**, № 4.—С. 752—759.
8. *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.
9. *Grajevskaja 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. *Kirillov S. V., Makarov E. M., Semenov Yu. P.* Quantitative study of interaction of deacylated tRNA with *Escherichia coli* ribosomes // FEBS Lett.—1983.—**157**, N 1.—P. 91—94.
11. *Binding of complementary oligonucleotides to aminoacylated tRNA<sup>Phe</sup> from yeast* / O. Pongs, P. Wrede, V. A. Erdmann, M. Sprinzi // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1976.—**71**, N 4.—P. 1025—1033.

Отдел генетики растений АН МССР, Кишинев  
Ленинград, ин-т ядерной физики  
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 9.04.85

УДК 577.217.337

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ НЕАКТИВНЫХ КОНФОРМЕРОВ тРНК С ЛЕЙЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗОЙ ИЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

**Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская**

Появление биологически неактивных форм тРНК наблюдается при некоторых состояниях организма животных, сопровождающихся изменением биосинтеза белков [1—3]. Ранее нами показано, что значения термодинамических параметров конформационного перехода при ренатурации *in vitro* сходны для неактивных конформеров тРНК, вы-

деленных при различных состояниях организма, а величины энтальпии активации, составляющие около 30 ккал/моль, свидетельствуют о заметном изменении пространственной структуры тРНК при ренатурации [4]. Особый интерес вызывают принципиальная возможность и особенности взаимодействия биологически неактивных конформеров тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазами. При изучении термостабилизации лейцил-тРНК-синтетазы (ЛРС) из печени кроликов было показано, что неактивные конформеры тРНК способны взаимодействовать с ЛРС, причем термостабильность фермента в комплексе с различными конформерами тРНК значительно уменьшалась в ряду  $\text{тРНК}^{\text{a}} \cdot \text{ЛРС} > \text{ЛРС} > \text{тРНК}^{\text{a}+\text{n}} \cdot \text{ЛРС}$  [5]. Для объяснения обнаруженного явления

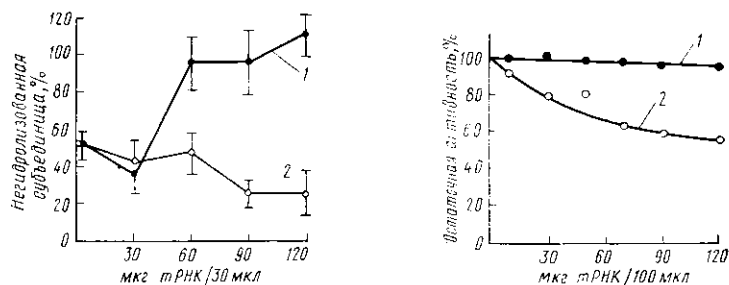


Рис. 1. Влияние тРНК<sup>а</sup> (1) и тРНК<sup>а+н</sup> (2) на трипсинолиз ЛРС из печени кроликов. За 100 % принято количество нерасщепленного белка, инкубированного без трипсина и тРНК. Превышение 100 %-ного уровня при максимальной концентрации тРНК<sup>а</sup>, возможно, является следствием защиты белка этой тРНК от действия эндогенных протеаз. Усреднение по 4—6 опытам.

Fig. 1. Influence of tRNA<sup>a</sup> (1) and tRNA<sup>a+n</sup> (2) (tRNA<sup>a+n</sup> — a mixture of biologically active and inactive tRNA conformers) on the partial proteolysis of the leucyl-tRNA synthetase. Quantity of unsplitting protein incubated without trypsin and tRNA is taken for 100 %. The exceeding of the 100 % level in the case of maximum concentration of tRNA<sup>a</sup> may be a consequence of tRNA<sup>a</sup> protection of LRS against endogenous proteolysis. The data result from 4-6 experiments.

Рис. 2. Влияние тРНК<sup>а</sup> (1) и тРНК<sup>а+н</sup> (2) на активность ЛРС. До внесения дополнительных количеств тРНК все пробы содержали избыток тРНК<sup>а</sup> — 20 мкг. Активность фермента в реакции аминокислотирования при «насыщающей» концентрации тРНК<sup>а</sup> принята за 100 %.

Fig. 2. Influence of tRNA<sup>a</sup> (1) and tRNA<sup>a+n</sup> (2) on the LRS activity. Before the addition of tRNA all probes contained the excess of tRNA<sup>a</sup> — 20 μg. The enzyme activity at the saturating tRNA<sup>a</sup> concentration is taken for 100 %.

нами было высказано два предположения. Во-первых, наблюдаемый эффект может быть следствием более «рыхлой» пространственной структуры фермента в комплексе с неактивными конформерами тРНК. Во-вторых, неактивные конформеры тРНК, образуя с ЛРС стабильный, но непродуктивный комплекс, могут снижать концентрацию функционирующего фермента, вызывая не связанную с термостабилизацией потерю ферментативной активности. В настоящей работе приведены результаты исследований по выяснению справедливости высказанных предположений.

Препараты тРНК получали из печени голодавших 10—12 сут и контрольных кроликов по стандартной методике [4]. Очищенный препарат ЛРС выделяли, как описано ранее [6], за исключением того, что элюцию фермента с ДЭАЭ-целлюлозы проводили в нелинейном градиенте 0,05—0,4 М NH<sub>4</sub>Cl. Для дальнейшей очистки ЛРС хроматографировали на рРНК-сефарозе, оксипатите, рН 6,5, сорбенте МоноQ и оксипатите, рН 8,0. Чистота полученного препарата ЛРС по данным электрофореза составила свыше 80 %. Ренатурацию биологически неактивных конформеров тРНК и определение активности ЛРС проводили, как описано в [5]. Трипсинолиз ЛРС проводили в 0,025 М Na-какодильном буфере, рН 7,0, в течение 10 мин при весовом соотношении трипсин : ЛРС, равном 1 : 10. ЛРС и тРНК преинкубировали в отсутствие трипсина 4 мин для образования комплексов. Пробу, содержащую все компоненты реакционной смеси, кроме трипсина, подвергали идентичным процедурам, она служила контролем на эндогенную протеазную активность препаратов тРНК и ЛРС. Электрофорез продуктов протеолиза проводили по [7]. При этом мы не обнаружили значительных

\* тРНК<sup>а</sup> — тРНК, содержащая только активные конформеры; \*\* тРНК<sup>а+н</sup> — тРНК, содержащая смесь биологически активных и неактивных конформеров.

по размеру триптических фрагментов ЛРС, что, вероятней всего, связано с присутствием в препарате трипсина фирмы «Спофа» (ЧССР) дополнительных протеазных активностей, приводящих к более полному гидролизу фермента. О ходе протеолиза в данном случае судили по степени сохранности исходной белковой субъединицы. Гели фотографировали и денситометрировали на аппарате МК-2 «Джойс». Результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента в доверительном интервале 0,05.

Результаты изучения влияния различных концентраций тРНК на ограниченный протеолиз ЛРС представлены на рис. 1. Видно, что увеличение концентрации тРНК<sup>а</sup> приводило к защите субъединицы фермента от расщепления. В то же время тРНК<sup>а+и</sup> не оказывала на ЛРС защитного действия, а при увеличении ее концентрации наблюдалась тенденция к ускорению протеолиза. Инкубация ЛРС с тРНК<sup>а+и</sup> в отсутствие трипсина не вызывала расщепления субъединицы фермента, что свидетельствует об отсутствии протеазной активности в препарате тРНК<sup>а+и</sup>. Результаты настоящих исследований хорошо коррелируют с данными о влиянии тРНК<sup>а+и</sup> и тРНК<sup>а</sup> на термoinактивацию ЛРС [5] и подтверждают то, что в условиях, близких по ионному составу, величине рН и соотношению тРНК<sup>Leu</sup>:ЛРС к условиям термoinактивации, пространственная структура ЛРС в присутствии тРНК<sup>а+и</sup> и тРНК<sup>а</sup> заметно отличается, причем, судя по большей доступности действию протеаз, она более «разрыхлена» в комплексе с биологически неактивными конформерами. Поскольку в препарате тРНК<sup>а+и</sup> содержатся приблизительно равные количества активных и неактивных конформеров [4], отсутствие «видимого» защитного действия активных конформеров при протеолизе и термoinактивации фермента в присутствии тРНК<sup>а+и</sup> может свидетельствовать о меньшем воздействии на ЛРС активных конформеров тРНК по сравнению с неактивными.

Для проверки второго предположения (о способности неактивных конформеров тРНК путем образования прочного комплекса с ЛРС вызывать не связанную с термoinактивацией потерю ферментативной активности [5]) было изучено влияние тРНК<sup>а+и</sup> на скорость реакции аминоацилирования ЛРС нативной тРНК<sup>Leu</sup> (рис. 2). Видно, что добавление возрастающих количеств тРНК<sup>а+и</sup> приводит к существенному ингибированию активности ЛРС, в то время как внесение в систему таких же количеств тРНК<sup>а</sup> не оказывает влияния. Следует подчеркнуть, что ренатурация биологически неактивных конформеров, т. е. перевод тРНК<sup>а+и</sup> в тРНК<sup>а</sup>, приводила к исчезновению ингибиторного эффекта. Итак, тРНК<sup>а+и</sup>, очевидно, за счет образования прочного, но непродуктивного комплекса с ферментом способна ингибировать реакцию аминоацилирования нативной тРНК<sup>Leu</sup>.

Таким образом, получены новые экспериментальные доказательства в пользу высказанного ранее предположения о том, что биологически неактивные конформеры тРНК образуют с ЛРС комплексы, отличающиеся по своим свойствам от комплексов фермента с активными конформерами тРНК.

#### INTERACTION OF BIOLOGICALLY INACTIVE tRNA CONFORMERS WITH LEUCYL-tRNA SYNTHETASE FROM RABBIT LIVER

*B. S. Negrutsky, A. V. El'skaya*

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

#### Summary

The partial proteolysis of leucyl-tRNA synthetase (LRS) was carried out in the presence of different tRNA conformers. Active tRNA conformers (tRNA<sup>а</sup>) were found to protect the LRS against proteolysis, while inactive conformers (tRNA<sup>и</sup>) did not show the protecting effect. tRNA<sup>а+и</sup> inhibited the rate of aminoacylation as evidenced by the inhibitory analysis, but tRNA<sup>а+и</sup> renaturation eliminated this effect.

These results as well as recent data on LRS thermoinactivation demonstrate the difference between tRNA<sup>а</sup>·LRS and tRNA<sup>а+и</sup>·LRS complexes.

1. *Биологически* неактивные транспортные РНК печени животных / Г. Х. Мацука, Т. П. Бабий, Э. Б. Сквирская и др. // Биохимия.—1973.—38, № 6.— С. 1221—1227.

2. Демидов С. В., Коваленко М. И., Ельская А. В. Изучение биологической активности тРНК печени кроликов разного возраста // Биол. науки.—1980.— № 12.— С. 18—24.
3. Изучение молекулярных основ нарушения биосинтеза белка при экспериментальном инфаркте миокарда и аутолизе миокарда / М. И. Коваленко, Г. А. Родовичюс, А. И. Тамулявичюс и др. // Молекуляр. биология.—1984.— вып. 37.— С. 18—21.
4. Негруцкий Б. С., Солдаткин К. А. Термодинамическая оценка конформационных переходов при ренатурации биологически неактивных конформеров тРНК // Там же.— С. 26—28.
5. Негруцкий Б. С., Ельская А. В. Особенности тепловой инактивации лейцил-тРНК-синтетазы в присутствии различных конформеров тРНК // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.— С. 1297—1300.
6. Гудзера О. И., Ельская А. В. Метод выделения лейцил-тРНК-синтетазы из молочной железы и определение ее молекулярного веса // Методы молекулярной биологии.— Киев: Наук. думка, 1979.— С. 127—133.
7. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // J. Biol. Chem.—1969.—244, N 16.— P. 4406—4413.

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

Получено 11.05.85

УДК 547.963.3

### ВЛИЯНИЕ БИОМАССЫ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК *POLYSCIAS FILICIFOLIA* BAILEY НА АКТИВНОСТЬ тРНК И АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕАЗ ПЕЧЕНИ КРОЛИКОВ

Р. Ю. Славинскене, Л. Ю. Лукошявичюс, В. А. Кунах,  
Л. И. Слепян, М. И. Коваленко, Л. Л. Иванов

Первым этапом биосинтеза белка является образование аминоксил-тРНК, уровень которых в клетке определяется специфическим взаимодействием тРНК и аминоксил-тРНК-синтетаз (АРСаз). Ранее показано существенное изменение активности ряда тРНК и АРСаз, выделенных из печени кроликов через 6—24 ч после воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ) [1]. Полученные данные явились основой для изучения возможности направленного воздействия на функциональную активность компонентов трансляционного аппарата клеток печени при стрессовом состоянии организма, вызванном ЭИМ.

Полисциас папоротниколистый, *Polyscias filicifolia* Bailey, произрастает в тропиках, где используется в народной медицине как заменитель женьшеня. Культура ткани этого растения была получена в Ленинградском химико-фармацевтическом институте в 1971 г. Предварительные химические исследования биомассы культивируемых клеток полисциаса показали наличие в ней тритерпеновых гликозидов, а настойка, полученная из этой биомассы, оказывает на мышей действие, аналогичное действию женьшеня [2]. Настоящая работа посвящена изучению влияния биомассы культивируемых клеток полисциаса папоротниколистого на уровень аминокислотирования тРНК<sup>лей</sup> и ферментативную активность лейцил-тРНК-синтетазы печени кроликов через 6 ч после ЭИМ. Выбор аминокислоты обусловлен значительным снижением акцептирования лейцина тРНК печени кролика в первые сутки ЭИМ, в то время как лейцил-тРНК-синтетазная активность в этот период увеличивается на 30%. Установлено, что снижение акцепторной активности препаратов тРНК является следствием перехода некоторых тРНК печени в биологически неактивную конформацию при ЭИМ. Что же касается АРСаз, то в отличие от тРНК наблюдается увеличение лейцил-тРНК-синтетазной активности в экстрактах печени через 6 ч после окклюзии коронарной артерии [1]. Исследования проведены на кроликах-самцах массой 2,5—3,0 кг. Моделью ЭИМ служила окклюзия коронарной артерии сердца [3]. Кролики получали перорально три раза в день в течение двух дней до операции по 13 мг высушенной биомассы культуры ткани полисциаса. Непосредственно перед операцией доза была увеличена до 26 мг. Методы выделения суммарных тРНК и АРСаз, условия определения акцепторной активности описаны ранее [4].

Согласно данным, приведенным в таблице, способность тРНК печени акцептировать лейцин существенно снижается при ЭИМ. При введении животным перед опера-