

## СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОАЦИЛ-тРНК С А-УЧАСТКОМ НЕ ВЫЗЫВАЕТ УДАЛЕНИЯ ДЕАЦИЛИРОВАННОЙ тРНК ИЗ Е-УЧАСТКА 70S РИБОСОМЫ

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

**Введение.** Основой ревизии модели элонгации Уотсона [1—3] явилось обнаружение в ряде лабораторий [4—6] третьего, дополнительного, участка для связывания деацилированной тРНК (Е-участка) на рибосомах *Escherichia coli*, существование которого у эукариот было показано ранее [7]. Свойства Е-участка были детально изучены в ряде работ [4, 6, 8—10], однако они сильно различаются по данным разных авторов.

Одной из особенностей цикла элонгации, предложенного Нирхаусом [3], является взаимодействие А- и Е-участков рибосомы. А именно, связывание аминоксил-тРНК с А-участком рибосом и/или образование пептидной связи, приводящие к удалению деацилированной тРНК из Е-участка. Однако эта особенность не подтверждается экспериментами Винтермайера с сотр. [11].

В данной работе мы попытались проверить это положение для модели элонгации Нирхауса в модельной системе с последовательной сорбцией различных видов тРНК на комплексе [70S+поли(U)].

**Материалы и методы.** Субчастицы рибосом *E. coli* MRE-600 выделены, как описано ранее [12], 70S рибосомы формировали из 30S и 50S субчастиц. Поли(U) со средней молекулярной массой около 30 000 получали по процедуре, описанной в [13]. Получение препаратов тРНК описано в [14—16]. Фактор элонгации *EF-Tu* выделен, как в работе [17]. Антибиотик тетрациклин («Серва», ФРГ) использовали в конечной концентрации 0,05 мМ.

Условия проведения экспериментов даны в подписях к рисункам. Величину  $\bar{v}$  (среднее количество молекул тРНК на рибосому) определяли методом фильтрации через нитроцеллюлозные мембранные фильтры («Супрог», № 6, СССР).

**Результаты и обсуждение.** Чтобы проверить, приводит ли сорбция аминоксил-тРНК на А-участке 70S рибосом к диссоциации деацилированной тРНК из Е-участка, при 10 мМ магния был сформирован комплекс [70S+поли(U)+2тРНК<sup>Phe</sup>] (тРНК равномерно мечена <sup>14</sup>C). К образованному комплексу добавили меченную по тритию аминоксил-тРНК и следили за поведением обоих видов тРНК (рис. 1). Из рисунка видно, что по мере связывания аминоксил-тРНК из комплекса диссоциирует примерно такое же количество деацилированной тРНК. Одна из молекул деацилированной тРНК связана с Р-участком рибосом, обладающим значительно более высоким сродством к тРНК, чем А- и Е-участки [14]. Если вторая молекула деацилированной тРНК связана исключительно с Е-участком, а А-участок вакантен, то результат эксперимента можно трактовать как влияние взаимодействия аминоксил-тРНК с А-участком на взаимодействие деацилированной тРНК с Е-участком рибосом. Однако при 10 мМ концентрации магния вторая молекула деацилированной тРНК не связана с Е-участком, а находится на А-участке, что видно из опыта, приведенного на рис. 2 и показывающего, что связывание деацилированной тРНК ингибируется тетрациклином в концентрации 0,05 мМ. При этой концентрации тетрациклин не влияет на взаимодействие тРНК с Р- и Е-участками рибосомы [14]. Таким образом, в опыте на рис. 1 имеет место обмен деацилированной тРНК, сорбированной на А-участке, на аминоксил-тРНК из раствора.

При повышении концентрации ионов магния до 18 мМ связывание аминоксил-тРНК с А-участком (как бесфакторное, так и *EF-Tu*-зависимое) не приводит к диссоциации деацилированной тРНК из рибосо-

мы (рис. 3). Это, по-видимому, обусловлено тем, что при повышении концентрации магния сродство деацелированной тРНК к Е-участку значительно выше, чем к А-участку. Так, величина константы ассоциации тРНК с Е-участком более зависима от концентрации ионов магния ( $\ln(K)/\ln(Mg) = 4$ ), чем таковая в случае А-участка.

Таким образом, на основании описанных выше экспериментов можно утверждать, что связывание аминоксил-тРНК с А-участком не приводит к диссоциации деацелированной тРНК из Е-участка рибосом в

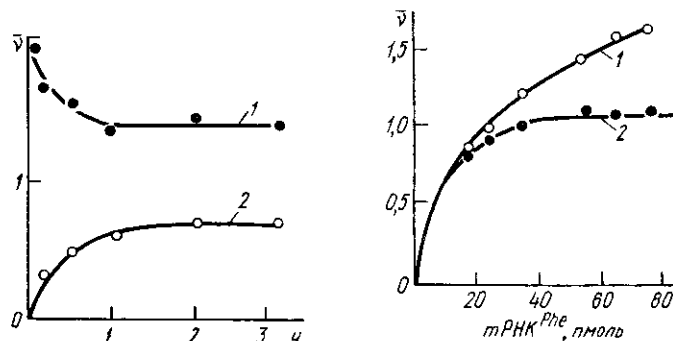


Рис. 1. Кинетика связывания  $[^3H]$ Phe-тРНК с комплексом  $[70S + \text{поли}(U) + [^{14}C]\text{тРНК}^{\text{Phe}}]$ . Инкубационная смесь объемом 0,05 мл в буферном растворе 0,02 М трис-НСl, рН 7,4, 0,01 М  $MgCl_2$ , 0,2 М  $NH_4Cl$ , 0,001 М ЭДТА содержала 5 пмолей 70S, 2,5 мкг поли(U), 100 пмолей  $[^{14}C]\text{тРНК}^{\text{Phe}}$ . После 1 ч инкубации при 25 °С вносили по 27 пмолей  $[^3H]$ Phe-тРНК<sup>Phe</sup> и следили за уровнем связывания деацелированной тРНК (1) и аминоксил-тРНК (2)

Fig. 1. Kinetics of Phe-tRNA<sup>Phe</sup> binding to  $[70S + \text{poly}(U) + \text{deacylated tRNA}^{\text{Phe}}]$  complex

Рис. 2. Влияние тетрациклина на связывание  $[^{14}C]$ тРНК<sup>Phe</sup> с комплексом  $[70S + \text{поли}(U)]$  при 0,01 М  $MgCl_2$ : 1 — связывание тРНК в отсутствие антибиотика; 2 — в его присутствии. Инкубационная смесь объемом 0,1 мл в буферном растворе 0,02 М трис-НСl, рН 7,4, 0,01 М  $MgCl_2$ , 0,2 М  $NH_4Cl$ , 0,001 М ЭДТА содержала 10 пмолей 70S, 5 мкг поли(U) и переменное количество  $[^{14}C]$ тРНК<sup>Phe</sup>. Инкубация 1 ч при 25 °С

Fig. 2. Inhibition of deacylated tRNA<sup>Phe</sup> binding to the  $[70S + \text{poly}(U)]$  complex by tetracycline at 10 mM  $MgCl_2$

модельной системе, где Р- и Е-участки заняты деацелированной тРНК. Кажущееся влияние связывания аминоксил-тРНК с А-участком на диссоциацию деацелированной тРНК из Е-участка при 10 мМ магнии (рис. 1) объясняется обменом деацелированной тРНК, связанной с А-участком, на аминоксил-тРНК из раствора.

В вышеописанной модельной системе с Р-участком рибосомы связана деацелированная тРНК, и образование пептидной связи невозможно. Однако не исключена возможность, что именно образование пептидной связи приводит к диссоциации деацелированной тРНК из Е-участка рибосом [3].

Опыт, приведенный на рис. 4, показывает, что не только связывание аминоксил-тРНК с А-участком, но и образование пептидной связи между аминоксил-тРНК на А-участке и пептидил-тРНК на Р-участке не влияют на связывание деацелированной тРНК с Е-участком. Этот эксперимент проводили при 15 мМ магнии в три этапа. 1. На первом этапе с комплексом  $[70S + \text{поли}(U)]$  связывали AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup> (для измерения связывания отбирали аликвоты по 0,1 мл), подобрав ее концентрацию так, чтобы были заняты все Р-участки рибосом [15, 18]. 2. После 1,5 ч инкубации на каждые 10 пмолей рибосом добавили по 50 пмолей  $[^3H]$ тРНК<sup>Phe</sup> в малом объеме и отбирали аликвоты, содержащие по 10 пмолей 70S рибосом для измерения связывания. Затем добавляли минимальное количество деацелированной тРНК, необходимое для занятия всех Е-участков рибосом, вторую инкубацию проводили в течение 5 мин, поскольку кинетика связывания деацелированной тРНК с Е-участком быстрая [14]. 3. После образования комплекса рибосом с пептидил-тРНК на Р-участке и деацелированной тРНК на

Е-участке к нему прибавили  $[^{14}\text{C}]\text{Phe-tRNK}^{\text{Phe}}$  из расчета 60 пмолей на точку, ГТФ до концентрации 0,001 М и 1 пмоль *EF-Tu* на точку и следили за уровнем связывания аминоксил- и деацилированной тРНК. Из рис. 4 видно, что связывание аминоксил-тРНК и образование пептидной связи (контролируемые по образованию ацетилдифенилалани-

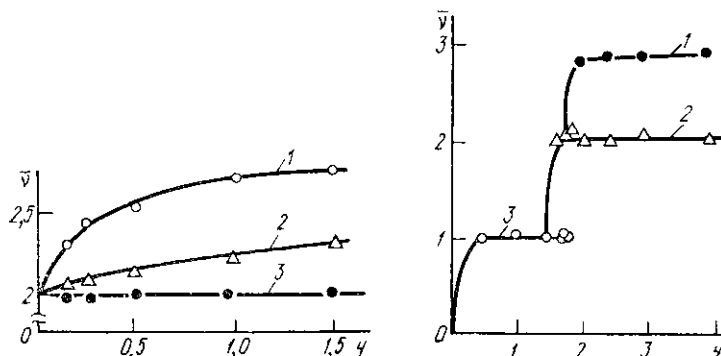


Рис. 3. Кинетика связывания комплексов  $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNK}^{\text{Phe}}+\text{Tu}+\text{ГТФ}$  и  $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNK}^{\text{Phe}}$  с комплексом  $[70\text{S}+\text{поли}(\text{U})+[^{14}\text{C}]\text{тРНК}^{\text{Phe}}]$  при 0,018 М  $\text{MgCl}_2$ : 1 — в присутствии ГТФ и *EF-Tu*; 2 — связывание аминоксил-тРНК в отсутствие *EF-Tu*; 3 — уровень связывания деацилированной тРНК. Инкубационная смесь объемом 0,5 мл в буферном растворе 0,018 М трис-НСl, рН 7,4, 0,018 М  $\text{MgCl}_2$ , 0,18 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,001 М ЭДТА и 0,005 М 2-меркаптоэтанол содержала 6 пмолей 70S, 3 мкг поли(U), 20 пмолей  $[^{14}\text{C}]\text{тРНК}^{\text{Phe}}$ . После 1 ч инкубации при 15 °С добавили 24 пмоля  $[^3\text{H}]\text{Phe-tRNK}$  и, если необходимо, 5 пмолей *EF-Tu* и ГТФ в концентрации 0,5 мМ

Fig. 3. Kinetic of  $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$  binding to the  $[70\text{S}+\text{poly}(\text{U})+\text{deacylated tRNA}^{\text{Phe}}]$  complex at 18 мМ  $\text{MgCl}_2$ , in the presence and absence of *EF-Tu* and GTP

Рис. 4. Влияние связывания аминоксил-тРНК с А-участком на взаимодействие деацилированной тРНК с Е-участком 70S рибосом: 1 — связывание  $\text{Phe-tRNK}^{\text{Phe}}$ ; 2 — связывание  $\text{тРНК}^{\text{Phe}}$ ; 3 — связывание  $\text{AcPhe-tRNK}^{\text{Phe}}$ . Инкубационная смесь в 0,02 М трис-НСl-буфере, рН 7,4, 0,2 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,015 М  $\text{MgCl}_2$  содержала в 0,1 мл 10 пмолей 70S рибосом, 2 мкг поли(U) и 32 пмоля  $[^{14}\text{C}]\text{AcPhe-tRNK}$

Fig. 4. Influence of aminoacyl-tRNA binding to the A-site of 70S ribosome on the deacylated tRNA interaction with E-site

на, как описано в [12]) не меняют уровня связывания деацилированной тРНК с Е-участком.

Таким образом, в модельной системе с последовательной сорбцией различных форм тРНК на функциональные участки рибосом связывание аминоксил-тРНК с А-участком, а также образование пептидной связи в рибосомах не приводят к диссоциации деацилированной тРНК из Е-участка рибосом.

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

#### BINDING OF AMINOACYL-tRNA TO A-SITE INDUCES NO REMOVAL OF DEACYLATED tRNA FROM E-SITE OF 70S RIBOSOME

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

V. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad, Gatchina

\* Institute of Ecological Genetics, Academy of Sciences of the Moldavian SSR, Kishinev

#### Summary

*EF-Tu*-dependent and independent aminoacyl-tRNA binding to A-site of 70S ribosome as well as peptide-bound formation have no influence on the binding and dissociation of deacylated tRNA with E-site of ribosome.

1. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 80, N 14.— P. 4213—4217.

2. Nierhaus K. H., Rheinberger H.-J. An alternative model for the elongation cycle of protein biosynthesis // Trends Biochem. Sci.—1984.—9, N 10.—P. 428—432.
3. Nierhaus K. H. New aspects of the ribosomal elongation cycle // Nucl. and Cell. Biochem.—1984.—61, N 1.—P. 63—81.
4. 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.
5. Rheinberger H.-J., Nierhaus K. H. Simultaneous binding of three tRNA molecules by the ribosomes of *Escherichia coli* // Biochem. Int.—1980.—1, N 4.—P. 297—303.
6. Grajevskaja R. A., Ivanov Yu. V., Saminski 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.
7. Wettstein F. O., Noll H. Binding of transfer ribonucleic acid to ribosomes in protein synthesis. Number and properties of ribosomal binding sites // J. Mol. Biol.—1965.—11, N 1.—P. 35—53.
8. 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.
9. Lill R., Robertson J. M., Wintermeyer W. tRNA-ribosome complex formation: equilibrium and kinetic studies // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.—1983.—364, N 9.—P. 1171—1172.
10. Дорохов Д. Б., Бурд С. Б., Семенов Ю. П. Взаимодействие тРНК<sup>Phe</sup>-С-С-А(3'NH)-Phe — аналога аминоацил-тРНК с 70S рибосомой // Изв. АН МССР.—1985.—№ 4.—С. 10—13.
11. Robertson J. M., Lill R., Wintermeyer W. Elongation factor G-induced realised of tRNA during ribosomal translocation // 5th Int. symp. metabolism and enzymol. of nucl. acids.—Bratislava: Publ. Hause Slovak Acad. Sci., 1984.—P. 349—360.
12. 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.
13. Katunin V. I., Semenov Yu. P., Kirillov S. V. Comparative study of polyuridylic acid binding with 30S subunits and 70S ribosomes of *Escherichia coli* // Ibid.—N 2.—P. 403—421.
14. 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.
15. Kirillov S. V., Semenov Yu. P. Non-exclusion principle of Ac-Phe-tRNA interaction with the donor and acceptor sites of *Escherichia coli* ribosomes // FEBS Lett.—1982.—148, N 2.—P. 235—238.
16. 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. Odinzov, Yu. P. Semenov // Eur. J. Biochem.—1978.—89, N 3.—P. 305—313.
17. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y. Studies on polypeptide elongation factors from *E. coli* // J. Biol. Chem.—1972.—247, N 14.—P. 7029—7037.
18. Odinzov V. B., Kirillov S. V. Interaction of N-acetyl-phenylalanyl-tRNA with 70S ribosomes of *Escherichia coli* // Nucl. Acids Res.—1978.—5, N 10.—P. 3871—3879.

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

Получено 12.01.88

УДК 577.217.34

### ФОТОАФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ Е-САЙТА РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*

С. Н. Владимиров, Д. М. Грайфер, М. А. Зенкова, Г. Г. Карпова,  
Л. В. Оленина, С. В. Кириллов, Е. М. Макаров, В. И. Махно,  
Ю. П. Семенов

**Введение.** В последнее время в различных лабораториях было показано, что деацелированная тРНК (тРНК<sub>OH</sub>) в отличие от аминоацил- или пептидил-тРНК может связываться с 70S рибосомами в дополнительном сайте, отличном от классических А- или Р-сайтов [1—4]. Было сделано предположение о том, что этот сайт играет роль «выходного» (exit, или Е-сайт) для тРНК<sub>OH</sub> в цикле элонгации. Однако имеющиеся