Доклады Академии наук СССР
1976. Том 229, № 2

УДК 576.311.1

БИОХИМИЯ

С. В. КИРИЛЛОВ, В. И. МАХНО, Ю. П. СЕМЕНКОВ

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА ПОЛИУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ПРИСУТСТВИЯ РИБОСОМНОГО БЕЛКА SI НА СТАБИЛЬНОСТЬ КОМПЛЕКСА ТРАНСПОРТНОЙ РНК С МАЛОЙ СУБЧАСТИЦЕЙ РИБОСОМ

(Представлено академиком Е. М. Крепсом 8 I 1976)

В последние годы ряд работ ([1–4]) был посвящен измерению констант кодон-зависимого связывания тРНК с 30S субчастицами. Как и следовало ожидать, матричное связывание тРНК с 30S субчастицами оказалось значительно сильнее (на 2—4 порядка), чем связывание без матрицы ([5]). Несколько обстоятельств характеризуют эти работы: 1) разный процент 30S субчастиц участвует в образовании комплекса 30S·полиУ·тРНК; 2) константы связывания, измеренные практически в одинаковых условиях, сильно различаются; 3) комплексы гетерогенны по стабильности ([4]). Причину этих различий естественно было искать в гетерогенности компонентов, из которых состоит комплекс, и в первую очередь в самих 30S субчастицах.

В ранее опубликованной нами работе ([3]), проведенной на 30S субчастицах, полностью активных в матрично-зависимом связывании тРНК, было показано, что 80—85% их образуют комплексы одинаковой стабильности (т. е. имеющие одну и ту же константу диссоциации K_d); остальные 15—20% субчастиц дают комплексы более стабильные, с величиной K_d на 1—2 порядка ниже. Примерно такая же доля 30S субчастиц, отмытых в процессе выделения при высокой концентрации ионов NH_4^+, содержит рибосомный белок SI ([6]). Этот белок стимулирует связывание полиУ с 30S субчастицей ([7]), и не исключено, что он может влиять на стабильность комплексов.

Выясняя природу гетерогенности комплексов 30S·полиУ·тРНК, мы обнаружили, что одной из ее основных причин является неоднородность полиУ по молекулярному весу. В то же время рибосомный белок SI, увеличивая сродство полиУ к 30S субчастице, не влияет ни на долю 30S субчастиц, способных связывать полиУ и $тРНК^{phe}$, ни на сродство $тРНК^{phe}$ к комплексу 30S·полиУ.

Методика. 30S субчастицы, полностью активные в полиУ-зависимом связывании тРНК, а также обогащенная ^{14}C-phe-$тРНК^{phe}$ с концентрацией субчастиц, способных связывать полиУ и $тРНК^{phe}$, ни на сродство $тРНК^{phe}$, были получены как описано в работе ([3]). В качестве нефракционированной матрицы использовалась полиуридиловая кислота фирмы «Реанал». Из этого препарата последовательной гель-фильтрацией на сефадексах G-200 и G-75 была выделена узкая фракция сравнительно низкомолекулярной полиУ со средним молекулярным весом 35 000 дальтон. Высокомолекулярной полиУ служила фракция препарата фирмы «Calbiochem» (США), выходящая без удержанного объема из колонки с сефарозой 4B и имеющая молекулярный вес более 300 000 дальтон. Гель-фильтрацию вели в буфере 0,01 *M* трис-HCl, pH 7,1, в присутствии 0,1 *M* NH_4Cl. При оценке молекулярных весов использованы соотношения между длиной цепи полиУ и ее константой седиментации, приведенные в работе ([8]). Рибосомный белок SI был выделен из чистых 30S субчастиц по методу, описанному в работе ([9]).

Измерения констант диссоциации проводили методами постоянного и переменного объема. В первом из них к смеси, содержащей в 15 мкл буфера, 5 пмол. 30S субчастиц и 5 мкг полиУ, добавляли 210 мкл буфера с 1—15 пмол. ^{14}C-phe-тРНК^{phe}. Метод переменного объема состоит в том, что к такой же смеси рибосом и полиУ добавляли 15 пмол. ^{14}C-phe-тРНК^{phe} в разных объемах буфера от 20 мкл до 4 мл. Инкубационные смеси после 40 мин. при 0° доводили холодным буфером до 0,5 мл (где нужно) и филь-

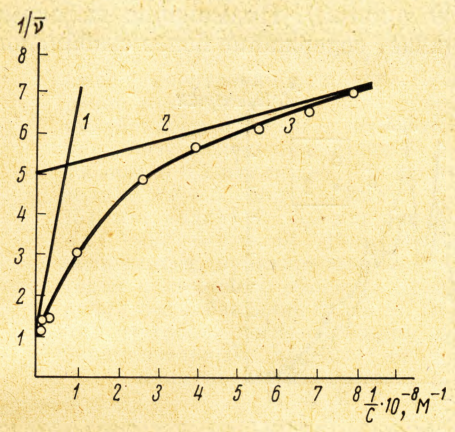


Рис. 1

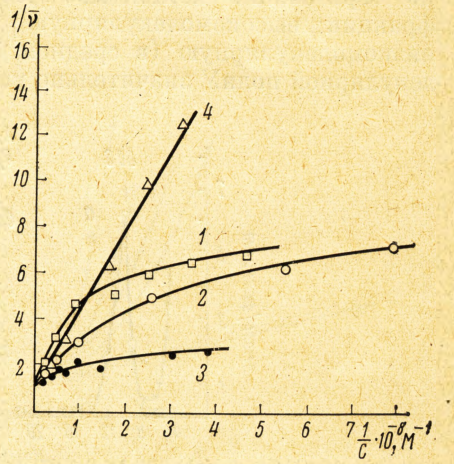


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость связывания ^{14}C-phe-тРНК^{phe} с 30S субчастицами от ее концентрации в растворе. Измерение методом постоянного объема инкубационной смеси в присутствии нефракционированной полиУ. *1* и *2* получены после разложения экспериментальной кривой *3* на две составляющие и отражают вклад соответственно менее стабильного и более стабильного комплексов

Рис. 2. Зависимость связывания ^{14}S-phe-тРНК^{phe} с 30S субчастицами от ее концентрации в растворе. Измерение методом постоянного объема. *1*, *2* — с разными препаратами нефракционированной полиУ; *3* — с высокомолекулярной полиУ; *4* — с низкомолекулярной полиУ

тровали по методу Ниренберга и Ледера ([10]) через нитроцеллюлозные фильтры с последующей промывкой двумя порциями буфера по 2 мл. Во всех экспериментах буферная среда имела состав: 0,02 *M* трис-HCl, pH 7,1; 0,02 *M* Mg^{2+}; 0,2 *M* NH_4^+; 0,01 *M* ЭДТА.

При достаточно большом избытке полиУ все 30S субчастицы связываются с матрицей, и обратимая сорбция ^{14}C-phe-тРНК^{phe} на комплексах 30S·полиУ описывается изотермой Лэнгмюра:

$$\bar{\nu} = MC/(K_d + C),$$

где $\bar{\nu}$ — среднее количество молекул тРНК^{phe}, связавшихся с одной 30S субчастицей, M — доля активных 30S субчастиц, C — равновесная концентрация свободной ^{14}C-phe-тРНК^{phe} и K_d — константа диссоциации тРНК^{phe} из комплекса 30S·полиУ·^{14}C-phe-тРНК^{phe}. Результаты октладывали в обратных координатах, в которых зависимость между $1/\bar{\nu}$ и $1/C$ должна быть линейной, если все участники комплекса гомогенны, а концентрация полиУ является избыточной.

Результаты и выводы. Экспериментальные зависимости между $1/\nu$ и $1/C$ при использовании нефракционированной полиУ получаются нелинейными (рис. 1), но хорошо описываются случаем, когда в инкубационной смеси имеется два вида комплексов, различных по стабильности, т. е. уравнением

$$\frac{1}{\bar{\nu}} = \frac{1}{\bar{\nu}_1 + \bar{\nu}_2} = \frac{1}{M_1 C/(K_{d_1} + C) + M_2 C/(K_{d_2} + C)},$$

где M_1 и M_2 — доли 30S субчастиц, входящих в состав этих комплексов, а K_{d_1} и K_{d_2} — соответствующие константы диссоциации.

Соотношение между величинами M_1 и M_2 не является постоянным и зависит от применяемых препаратов коммерческой полиУ (рис. 2, *1*, *2*), которые, как правило, сильно различаются по молекулярно-весовому распределению.

Для того чтобы более четко увидеть влияние молекулярного веса полиУ на образование комплексов разной стабильности, мы выделили две ее фракции: высокомолекулярную (более 300 000 дальтон) и сравнительно низкомолекулярную (в среднем 35 000 дальтон). Применение высокомолекулярной полиУ значительно увеличивает содержание более стабильного

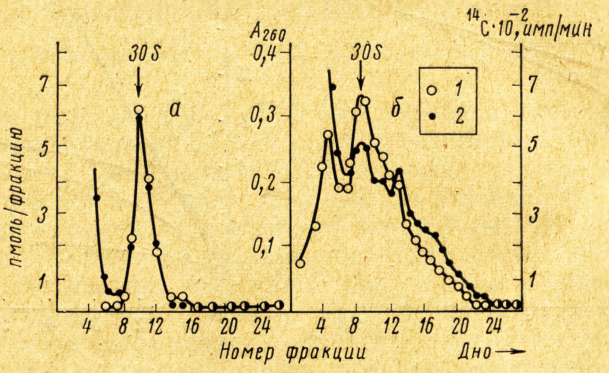


Рис. 3. Седиментация комплексов 30S·полиУ·^{14}C-phe-тРНК^{phe} через градиент концентрации сахарозы. *а* — с низкомолекулярной полиУ при 2°; *б* — с высокомолекулярной полиУ при 15°. В последнем случае при повышенной температуре в процессе седиментации происходит заметная диссоциация ^{14}C-phe-тРНК^{phe} из комплекса. Видно, что удельная активность более тяжелых фракций выше, т. е. они более стабильны. *1* — A_{260}; *2* — ^{14}C-радиоактивность

комплекса (рис. 2, *3*), тогда как с низкомолекулярной полиУ последний исчезает: зависимость между $1/\nu$ и $1/C$ становится линейной в широком интервале изменений $1/\nu$ (рис. 2, *4*). Анализ этих комплексов на градиенте концентрации сахарозы показывает, что гомогенный по стабильности комплекс (с низкомолекулярной полиУ, рис. 2, *4*) движется в виде симметричного пика с константой седиментации, близкой к 30S (рис. 3, *а*). С высокомолекулярной полиУ часть 30S субчастиц образует агрегаты с константой седиментации вплоть до 60—70S (рис. 3, *б*). Возможно, что это «полисомы»,— с одной длинной цепью полиУ связываются несколько 30S субчастиц, при этом их образование коррелирует с появлением более стабильного комплекса (рис. 2, *3*).

Естественно, что в общем случае, для 30S субчастиц, выделенных каким-либо другим способом, причиной гетерогенности комплексов может быть не только неоднородность полиУ по молекулярному весу, но и гетерогенность самих субчастиц.

Во всех предыдущих экспериментах $1/\nu \to 1$ при $1/C \to 0$. Сопоставление этого факта с тем, что только 10—30% 30S субчастиц, мытых в высокой ионной силе, содержат рибосомный белок SI ([6]), приводит к заключению, что наблюдаемая ранее стимуляция связывания полиУ, а следовательно, и тРНК^{phe}, с 30S субчастицами ([7]) вызывается действием этого белка не по принципу «все или ничего» (чем иногда объясняют малую долю субчастиц, активных в их декодирующей функции ([1]), а увеличением в определенных пределах константы связывания полиУ с 30S субчастицами без изменения доли субчастиц, способных связывать полиУ. Для выяснения характера влияния белка SI на образование комплекса 30S·полиУ·тРНК^{phe} мы применили метод переменного объема инкубационной смеси. В этом

случае, при использовании низкомолекулярной полиУ, наблюдается аномальное уменьшение связывания ^{14}C-phe-тРНК^{phe} при низких ее концентрациях (рис. 4, *3*). Это может быть вызвано тем, что с увеличением объема понижается концентрация не только ^{14}C-phe-тРНК^{phe}, но и полиУ; начиная с некоторого момента, она становится недостаточной для того, чтобы все 30S субчастицы были связаны с полиУ, и все бо́льшая их доля становится свободной, т. е. «неактивной» в связывании ^{14}C-phe-тРНК^{phe}. Эксперимент, в котором последовательное увеличение количества полиУ, добавляемой в инкубационные смеси, приводит к увеличению связывания ^{14}C-phe-тРНК^{phe} при неизменности ее концентрации в растворе, подтверждает это предположение (рис. 4, *1—4*). Тогда, если белок SI действительно стабилизирует комплекс 30S·полиУ, то количество свободных 30S субчастиц должно уменьшаться при его добавлении, что мы и наблюдаем в эксперименте (рис. 4, *5*). Более того, мы получили прямую линию и с тем же наклоном, что и в контрольном эксперименте, сделанном методом постоянного объема, т. е. с избыточной концентрацией полиУ во всех точках, но без добавления белка. Практическое совпадение этих прямых говорит о том, что сродство тРНК^{phe} к комплексу 30S·полиУ не зависит от присутствия в субчастицах белка SI.

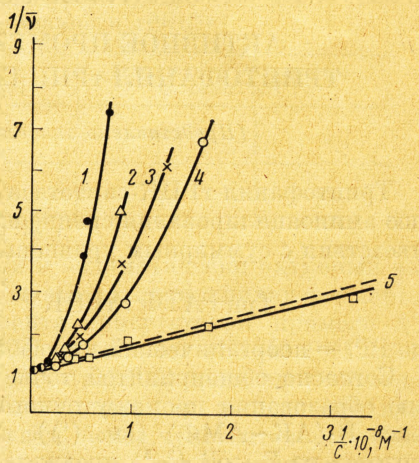


Рис. 4. Зависимость связывания ^{14}C-phe-тРНК^{phe} с 30S субчастицами от ее концентрации в растворе. Измерение методом переменного объема инкубационной смеси с использованием низкомолекулярной полиУ. *1* — добавлено 0,5 мкг полиУ; *2* — 2,0 мкг полиУ; *3* — 5,0 мкг полиУ; *4* — 15,0 мкг полиУ; *5* — 5,0 мкг полиУ+ +1,0 мкг белка SI. Контрольный эксперимент (пунктир) выполнен методом постоянного объема с 5,0 мкг полиУ без добавления белка SI. Прямая построена после обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов

Результаты, полученные в настоящей работе, приводят к следующим выводам. 1. Одной из основных причин гетерогенности комплекса 30S·полиУ·тРНК^{phe} по стабильности является гетерогенность полиУ по молекулярному весу. 2. Отсутствие рибосомного белка SI в части 30S субчастиц уменьшает стабильность комплекса 30S·полиУ, но не долю субчастиц, способных связывать полиУ и тРНК^{phe}. 3. Сродство тРНК^{phe} к комплексам 30S·полиУ и 30S·полиУ·SI одинаково. Это означает, что белок SI не создает на 30S субчастице дополнительных центров для взаимодействия с тРНК; отсутствие его в части субчастиц не может являться причиной гетерогенности по стабильности комплексов 30S·полиУ·тРНК^{phe}.

Ленинградский институт ядерной физики
им. Б. П. Константинова
Гатчина Ленинградской обл.

Поступило
12 XII 1975

ЛИТЕРАТУРА

[1] *H. Rappoport,* Arch. Biochem. and Biophys., v. 153, 797 (1972). [2] *Н. В. Белицына, М. А. Глухова, А. С. Спирин,* ДАН, т. 216, 925 (1974). [3] *С. Е. Бреслер, Г. П. Власов и др.,* ДАН, т. 220, 719 (1975). [4] *M. A. Gluchova, N. V. Belitsina, A. S. Spirin,* Europ. J. Biochem., v. 52, 197 (1975). [5] *R. A. Grajevskaya, V. B. Odinzov et al.,* FEBS Letters, v. 33, 11 (1973). [6] *P. Voynow, C. Kurland,* Biochemistry, v. 10, 517 (1971). [7] *J. van Duin, C. Kurland,* Mol. Gen. Genet., v. 109, 169 (1970). [8] *B. Janik, R. Sommer,* Biopolymers, v. 12, 2803 (1973). [9] *J. van Duin, P. van Knippenberg,* J. Mol. Biol., v. 84, 185 (1974). [10] *M. Nirenberg, P. Leder,* Science, v. 145, 1399 (1964).