

А. М. КОПЫЛОВ, Е. С. ШАЛАЕВА, А. А. БОГДАНОВ

**СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ,
ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ПРОЦЕССЕ САМОСБОРКИ МАЛОЙ
СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМЫ *ESCHERICHIA COLI***

(Представлено академиком А. С. Спириным 12 III 1974)

Известно, что скорость самосборки 30S субчастиц рибосом *E. coli* из 16S РНК и соответствующих белков лимитируется так называемым RI-переходом, в процессе которого неактивный предшественник субчастицы (RI) превращается в активированный РНП (RI*)⁽¹⁾. RI и RI* имеют примерно одинаковый набор белков (несколько более половины всех белков 30S субчастицы), однако только RI* способны присоединять недостающие белки и достраиваться до биологически активных субчастиц. RI-переход сильно зависит от температуры. Близкие по кинетике и оптимумам температуры и концентраций одно- и двухвалентных металлов переходы наблюдаются при образовании специфических комплексов рРНК с некоторыми рибосомными белками и в процессе сворачивания развернутых рибосом в биологически активные частицы^(1, 2). Изучение природы структурных превращений, лежащих в основе RI-перехода, может дать дополнительные сведения о внутренней организации рибосом.

В настоящей работе анализировались изменения в доступности функциональных групп белков, во вторичной структуре РНК и в стабильности РНК-белковых связей, происходящие при активировании RI (т.е. при RI-переходе). Для этого свойства RI сравнивались со свойствами RI*, а также 30S субчастиц и так называемых «литиевых» частиц (получаемых разборкой 30S субчастиц и по своему белковому составу и способности достраиваться до 30S субчастиц близких к RI*).

Рибосомы выделяли из клеток *E. coli*, штамм MRE 600, ранее описанным методом⁽³⁾. Субчастицы рибосом получали методом зонального ультрацентрифугирования⁽⁴⁾. 30S субчастицы дополнительно очищали центрифугированием при 186 000 *g* в течение 5 час в 0,1 *M* трис-HCl-буфере, pH 7, 8, содержащем 1 *M* NH₄Cl, 0,01 *M* ацетат магния и 0,006 *M* меркаптоэтанол. RI получали так, как это было описано ранее⁽¹⁾. Для активирования RI их раствор в ТМК-буфере для реконструкции (0,03 *M* трис-HCl-буфер, pH 7,7, содержащий 0,33 *M* KCl, 0,02 *M* ацетат магния и 0,003 *M* меркаптоэтанол) нагревали в течение 30 мин при 40°. Для получения «литиевых» частиц очищенные 30S субчастицы обрабатывали 2 *M* LiCl в ТМ-буфере (0,01 *M* трис-HCl-буфер, pH 7,8, содержащий 0,01 *M* ацетат магния и 0,006 *M* меркаптоэтанол); образовавшиеся РНП-частицы осаждали центрифугированием при 186 000 *g* в течение 6 час., вновь обрабатывали 2 *M* LiCl в том же буфере и осаждали в тех же условиях.

Реакцию РНП-частиц с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой (ТНБС) проводили следующим образом. К раствору препарата в буфере 0,05 *M* триэтаноламин-HCl, pH 8,0, содержащий 0,02 *M* ацетат магния; 0,35 *M* хлористый калий, 0,5% Brij-35) в кювете спектрофотометра добавляли 1/10 часть водного раствора ТНБС. Кинетику реакции снимали путем спектрофотометрирования в изобестической точке (для нашего буфера 367 нм; $E_{367} = 0,88 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) на автоматическом регистрирующем двухлучевом

спектрофотометре «Unicam» SP 700. Реакцию проводили в темноте, облучая кювету с препаратом только во время измерения. Центрифугирование препаратов в градиенте плотности растворов CsCl проводили по следующей методике. В центрифужную пробирку настилали: нижняя зона (1,5 мл) — насыщенный раствор хлористого цезия в ТМК-буфере (15°, ρ 1,85 г/см³); средняя зона (1 мл) — раствор РНП-частиц в ТМК-буфере, содержащий 6 М CsCl (ρ 1,75 г/см³) и верхняя зона (1,5 мл) — раствор хлористого цезия в ТМК-буфере (ρ 1,65 г/см³). Центрифугирование проводили в роторе SW-65 при 248 000 *g* в течение 17 час. Спектры кругового дихроизма (КД)

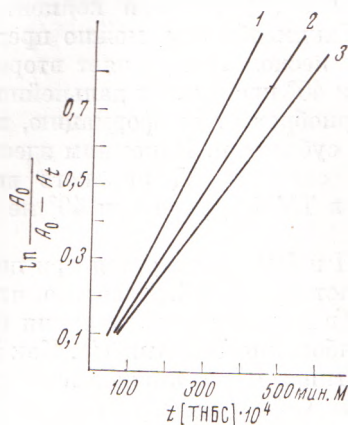


Рис. 1

Рис. 1. Кинетические кривые реакции модификации РНП избытком ТНБС. *t* — время в мин., [ТНБС] — концентрация реагента в М, *A*₀ — поглощение реакционной смеси при 367 нм при исчерпывающей модификации, *A*_{*t*} — то же в момент времени *t*. 1 — RI, 2 — 30S субчастицы, 3 — Li-частицы

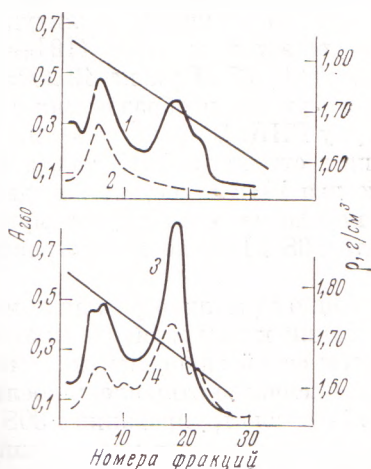


Рис. 2

Рис. 2. Ультрацентрифугирование РНП в градиенте плотности CsCl (условия в тексте). 1 — RI*, 2 — RI, 3 — Li-частицы, 4 — реконструированные в стандартных условиях дополнительно очищенные 30S субчастицы

измеряли на дихрографе «Roussel—Jouan» II так, как это было описано ранее (2).

ТНБС уже применялся Прессман и сотрудниками (6) для оценки количества ϵ -NH₂-групп в белках рибосом. Этот агент удобен тем, что, модифицируя белок, он дает окрашенный продукт с высоким коэффициентом молярной экстинкции, причем РНК ТНБС практически не модифицируется.

Как видно из рис. 1, неактивированные RI модифицируются существенно быстрее, чем исходные 30S субчастицы. Особенно большая разница наблюдается между скоростями модификации белков в RI и «литиевых» частицах. Отсюда можно заключить, что превращение RI в нативные РНП сопровождается заметной перестройкой их белкового компонента (большей вовлеченностью белков в межмолекулярные взаимодействия и (или) изменением конформации самих белков). В то же время при сравнении начальных скоростей модификации RI и RI* существенной разницы обнаружить не удается. На первый взгляд этот результат кажется странным, так как RI* по белковому составу и способности дотраиваться до 30S субчастиц близки к «литиевым» частицам. Известно, однако, что в отличие от Li-частиц, RI* содержат 3—4 белковых субъединицы из группы дополнительного белка, которые участия в RI-переходе не принимают и даже, может быть, отделяются от РНП при этом переходе (2). Взаимодействием этих

белков с ТНБС, по-видимому, и объясняется высокая начальная скорость модификации RI*.

Ранее было показано, что спектры КД свободной РНК и РНК в составе рибосом различаются по величине амплитуды первой положительной полосы (⁵). В настоящей работе мы сравнили спектры обеих форм RI-частиц со спектрами 30S субчастиц и 16S РНК. Оказалось, что по положению максимума и амплитуде первой положительной полосы спектры RI* и 30S субчастиц совпадают: $[\theta]_{RI^*} = 16\,300 \pm 200$, $[\theta]_{30S} = 16\,000 \pm 300$ (где $[\theta]$ — молярная (в расчете на один нуклеотидный остаток) эллиптичность при 263 нм). Спектр КД неактивированных RI приближается к спектру 16S РНК, хотя по величине амплитуды первой положительной полосы достоверно отличается от него ($[\theta]_{RI} = 18\,200 \pm 200$; $[\theta]_{16S}$ при концентрации ионов Mg^{2+} 0,005 *M* равна $19\,200 \pm 500$). Таким образом, можно предположить, что уже при образовании RI белок несколько изменяет вторичную структуру РНК. В процессе активации при 40° происходят дальнейшие изменения в структуре РНК так, что она приобретает конформацию, характерную для РНК в составе исходных 30S субчастиц. Напомним здесь, что белок не вносит в анализируемую часть спектра КД никакого вклада, а спектр 16S РНК, после прогревания ее в ТМК-буфере при 40° не изменяется.

Особенно отчетливо различие между RI и RI* проявляется при центрифугировании их в градиенте плотности растворов CsCl. Известно, что под действием солей одновалентных металлов в высокой концентрации происходит ступенчатое отщепление белка от рибосомных частиц (⁷). Как видно из рис. 2, реконструированные 30S субчастицы, RI* и «литиевые» частицы в условиях выбранных нами концентраций CsCl существуют в виде двух компонентов («тяжелого» и «легкого»), соотношение между которыми зависит от содержания белка в исходном РНП. В тех же условиях RI полностью превращаются в «тяжелый» компонент, т.е. большая часть белка этих частиц легко отделяется от РНК под воздействием CsCl. Следовательно, в результате RI-перехода структурные белки оказываются прочно связанными с РНК. Важно отметить, что любое отклонение от оптимальных условий самосборки 30S субчастиц (например, понижение концентрации ионов магния до 0,005 *M*) приводит к образованию РНП, под воздействием CsCl полностью диссоциирующих до «тяжелого» компонента. Таким образом, центрифугирование в градиенте плотности CsCl можно использовать для определения степени физической реконструкции рибосом на промежуточных этапах этого процесса.

Итак, в настоящей работе показано, что сущность RI-перехода — ключевой стадии реконструкции 30S субчастиц рибосом — состоит в реорганизации структуры РНП — тяжа в целом. При этом из РНП-частицы с неспецифическими связями между компонентами, легко диссоциирующей на РНК и белок, образуется стабильный рибонуклеопротеид, вторичная структура РНК в котором неотличима (по данным КД) от таковой в нативной 30S субчастице. Судя по данным химической модификации, в результате RI-перехода меняется упаковка белковых субъединиц в РНП, и их ε-NH₂-группы становятся менее доступными растворителю. Ранее мы показали, что при этом переходе уменьшается число мест на рибосомной РНК, способных сорбировать краситель акрифлавин (⁸). Недавно Хелд и Номура нашли, что в растворе с пониженной концентрацией ионов Mg^{2+} RI* имеют более высокие коэффициенты седиментации, чем неактивные частицы (²).

На этой стадии самосборки, по-видимому, завершается формирование наиболее важных для образования биологически активной 30S субчастицы элементов структуры рибонуклеопротеида. Действительно, последующее присоединение белка к RI* происходит с высокой скоростью и не зависит от температуры (¹). Иными словами, эти частицы можно рассматривать как своего рода «структурный остов» 30S субчастицы. Нам представляется

крайне важным, что формирование этого «остова» осуществляется при взаимодействии 16S РНК только с половиной (а возможно, и с меньшим числом) белков 30S субчастицы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
22 II 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ P. Traub, M. Nomura, J. Mol. Biol., v. 40, 391 (1969). ² W. Held, M. Nomura, Biochemistry, v. 12, 3273 (1973). ³ И. Н. Шатский, Н. В. Чичкова, А. А. Богданов, Молек. биол., т. 5, 149 (1971). ⁴ E. F. Eikenberg, T. A. Rickle et al., Europ. J. Biochem., v. 12, 113 (1970). ⁵ И. Н. Шатский, Н. В. Чичкова, А. А. Богданов, Молек. биол., т. 5, 817 (1971). ⁶ Е. К. Прессман, Л. С. Сандахчиев, А. П. Севастьянов, Биохимия, т. 37, 152 (1972). ⁷ A. S. Spirin, N. V. Belitsina, M. I. Lerman, J. Mol. Biol., v. 14, 611 (1965). ⁸ А. П. Потапов, Е. С. Шалаева и др., ДАН, т. 208, 468 (1973).