

УДК 576 : 547. 963.3

БИОХИМИЯ

Г. В. РЕЗАПКИН, И. Н. ШАТСКИЙ, А. А. БОГДАНОВ

РАЗВОРАЧИВАНИЕ МАЛОЙ СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ С КОВАЛЕНТНО СШИТЫМИ БЕЛКАМИ

(Представлено академиком А. С. Спириным 15 IV 1976)

Компактная конформация нативных субчастиц рибосом поддерживает совокупностью РНК-белковых, РНК-РНК и белок-белковых взаимодействий. При удалении ионов магния внутририбосомные взаимодействия нарушаются, и субчастицы рибосом переходят в разрыхленное состояние, что выражается в сильном понижении их констант седиментации. Это явление получило название процесса разворачивания рибосом (¹).

В настоящей работе исследовано разворачивание малой субчастицы рибосом *Escherichia coli*, обработанной би- и полифункциональными агентами, образующими белок-белковые сшивки. Этим путем мы рассчитывали получить ответ на вопрос о том, сколь существенна фиксация белковых субъединиц друг относительно друга для поддержания компактной структуры малой субчастицы рибосом.

30 S субчастицы рибосом получали из клеток *E. coli* штамм MRE 600, ранее описанным методом (²). В качестве сшивающих агентов использовали глутаровый альдегид, диметилловый эфир диамида пробковой кислоты и полиальдегиды — сополимеры акролеина и акриламида. Глутаровый альдегид широко применяется для фиксации структуры рибосом и предотвращения отщепления белков от рибосом при воздействии на них депротенизирующих агентов (³). Вторым реагентом был предложен Траутом и сотрудниками (⁴) для идентификации соседних белков в субчастицах рибосом. С его помощью в 30 S субчастице удается образовать не менее 12 ковалентно сшитых димеров и тримеров. Полиальдегиды получены нами сополимеризацией акролеина и акриламида в водной среде в присутствии алилового спирта. В качестве инициаторов полимеризации использовали персульфат аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Варьируя соотношение между компонентами реакционной смеси, получали полимеры с различным содержанием альдегидных групп. По окончании реакции смесь полимеров фракционировали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Количество альдегидных групп в полимере определяли спектрофотометрически по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (⁵). Молекулярный вес сополимеров акролеина и акриламида определяли по месту выхода их с колонки с сефадексом G=25 (0,9×100 см), откалиброванной с помощью полимеров акриламида с известным молекулярным весом. Для фиксации 30 S субчастиц применяли полиальдегиды с молекулярными весами от 150 до 5000.

Все использованные в настоящей работе агенты эффективно реагируют со свободными NH₂-группами белка. Поскольку белки в составе 30 S субчастицы имеют не менее 120 аминокислотных групп (в основном ε-аминогруппы лизина), доступных для реакций с различными химическими агентами (³), следовало ожидать, что применяемые нами агенты будут способны образовывать большое количество белок-белковых сшивок. Специальными контрольными опытами с полиальдегидами, меченными по углероду, было установлено, что они практически не связываются с РНК в условиях образования белок-белковых сшивок (не более 2 молекул полимера на одну молекулу РНК).

Схема опытов с 30 S субчастицами была следующей. Субчастицы, суспендированные в 0,05 M триэтанолламин-HCl буфере, pH 7,8, содержащем 0,01 M ацетат магния и 0,3 M KCl, обрабатывали сшивающим агентом (0,2 мг реагента на 1 о.е. рибосом, 1 час, 20°). В случае глутарового альдегида и полиальдегидов реакционную смесь обрабатывали затем NaBH₄ (конечная концентрация 0,5 мг/мл, 5°, 30 мин.) для восстановления оснований Шиффа и избыточных альдегидных групп. 30 S субчастицы диализовали сначала против 0,01 M трис-HCl буфера, pH 7,3, содержащего 0,01 M ЭДТА и 0,1 M KCl, а затем против буфера, указанного в табл. 1. С контрольным препаратом рибосом проделывали те же операции, за исключением обработки сшивающим агентом. Полученные образцы анализировали на сканирующей аналитической ультрацентрифуге. Spinco E, снабженной ультрафиолетовой оптикой. Результаты анализов приведены в табл. 1 и на рис. 1.

Как видно из приведенных данных, при удалении ионов магния из контрольных препаратов 30 S субчастиц они превращаются в частицы с коэффициентами седиментации 14—15 или 18—20 ед. Сведберга в зависимости от концентрации KCl в буфере. Близкие к контрольным препаратам коэффициенты седиментации имеют в том же буфере частицы, обработанные глутаровым альдегидом, диметиловым эфиром диимида пробковой кислоты или полиальдегидами с относительно невысокими молекулярными весами, хотя расстояние между функциональными группами в этих соединениях позволяет им образовывать ковалентные межбелковые связи. По мере увеличения длины цепи полиальдегида различие в константах седиментации контрольных и фиксированных частиц возрастает (рис. 1). Однако даже после воздействия на 30 S субчастицы агентов с длиной цепи в 25—40 Å они сохраняют способность разворачиваться до частиц с коэффициентами седиментации 20—24 ед. Сведберга. В то же время известно, что бифункциональные реагенты с расстоянием между активными группами в 18—24 Å способны превращать все белки 30 S субчастицы рибосом *E. coli* в димеры и тримеры (^{6, 7}).

Рибонуклеопротеидные частицы, сохраняющие свои исходные коэффициенты седиментации в безмагниевой среде, могут быть получены только при помощи полиальдегидов с длиной цепи не менее 70—80 Å. Как показали электронно-микроскопические исследования, проведенные В. Д. Васильевым в Институте белка АН СССР, эти частицы представляют собой компактные образования, мало отличающиеся по размерам от исходных 30 S субчастиц. Небольшое превышение их констант седиментации над константами седиментации 30 S субчастиц вызвано, как это показали контрольные опыты, утяжелением частиц за счет связывания с ними полимера.

Необходимо подчеркнуть, что при увеличении среднего расстояния между альдегидными группами в полимерах их способность фиксировать компактное состояние 30 S субчастицы снижается, и для полимеров, у которых эти расстояния равны 25 или даже 14 Å, «неразворачивающихся» РНП-частиц получить не удается. Таким образом, для фиксации компактной структуры субчастиц рибосом и предотвращения разворачивания их в безмагниевой среде необходимо выполнение следующих условий: фикси-

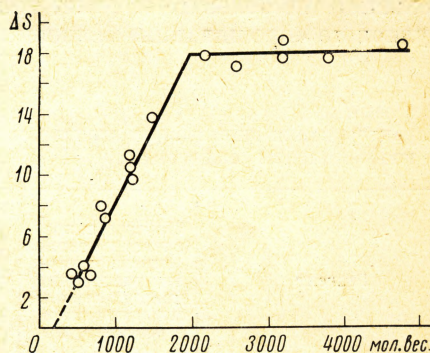


Рис. 1. Зависимость увеличения коэффициентов седиментации фиксированной малой субчастицы рибосом от молекулярного веса сополимера акрилена и акриламида (со средним расстоянием между альдегидными группами 9Å). ΔS — разница между коэффициентами седиментации фиксированных и контрольных препаратов субчастиц в 0,01 M трис-HCl буфере, pH 7,8 (в ед. Сведберга)

рующий агент должен быть способным сшивать не только находящиеся по соседству районы отдельных белковых субъединиц, но и участки белков, расположенные на большом расстоянии друг от друга; расстояние между функциональными группами в реагенте должно быть сравнительно небольшим (не более 10 Å), что, по-видимому, необходимо для внутримолекулярного «прошивания» белковых субъединиц и фиксации их на РНК.

Таблица 1

Характеристики сшивающих агентов, условия разворачивания 30S субчастиц рибосом и коэффициенты седиментации РНП-частиц в безмагниеых буферных растворах

Реагент	Максимальное (слева) и среднее (справа от черты) расстояние между активными группами в реагенте, Å	Состав буферных растворов для разворачивания РНП-частиц	Коэффициенты седиментации, ед. Сведберга	
			фиксированные субчастицы	контрольные субчастицы
Глутаровый альдегид	5,2/5,2	0,01 M трис-HCl, pH 7,8 (1)	17,0	14,5
		0,01 M трис-HCl, pH 7,8; 0,1 M KCl (2)	19,0	19,0
Диметилловый эфир диимида пробковой кислоты	12/12	0,01 M трис-HCl, pH 7,8; 0,1 M KCl	20,0	19,0
Сополимер акролеина и акриламида	15/9	0,01 M трис-HCl, pH 7,8	17,5	14,5
	40/9	То же	21,0	14,5
	80/9	» »	31,5	14,5
	80/14	» »	26,0	14,5
	80/25	» »	24,0	14,5

При интерпретации полученных результатов необходимо учитывать два фундаментальных свойства белков 30 S субчастицы рибосом *E. coli*. Во-первых, многие из белков малой субчастицы имеют в ее составе крайне асимметричную структуру, вследствие чего доступные с поверхности участки одних и тех же белков расположены в различных частях 30 S субчастицы⁽⁸⁾. Во-вторых, у белков, первичная структура которых полностью или частично известна, остатки лизина (составляющие около 10% от всех аминокислот) расположены вдоль всей полипептидной цепи⁽⁹⁾. В таком случае то, что компактную структуру 30 S субчастиц не удается сохранить в безмагниеовой среде при фиксации сравнительно короткими агентами, означает, что непосредственные физические контакты между белковыми субъединицами (если они и реализуются в рибосомах), по-видимому, несущественны для поддержания этой структуры. Далее, можно предположить, что области белков, находящиеся на поверхности 30 S субчастиц рибосом, сгруппированы в домены, в которых расстояние между соседними белками составляет 20—40 Å. Сшивание белков друг с другом в таких доменах приводит к фиксации разрыхленного состояния 30 S субчастицы (21 S), характерного для одного из промежуточных этапов разворачивания этой субчастицы⁽¹⁰⁾. И наконец, среднее расстояние между такими доменами не должно превышать 70—80 Å, так как, начиная с такой длины полиальдегида, наблюдается полная фиксация структуры субчастицы (рис. 1).

Как уже отмечалось, реагенты типа глутарового альдегида способны закреплять рибосомные белки на РНК. Результаты настоящей работы показывают, что фиксация РНК-белковых контактов (так же, как и образование белок-белковых сшивок сравнительно короткими агентами) не предо-

храняет рибосомы от разворачивания в безмагниевых буферных растворах. Это позволяет высказать предположение, что компактная структура рибосом формируется главным образом РНК-РНК взаимодействиями, т. е. взаимодействием между одно- и двуязыевыми участками, принадлежащими достаточно удаленным друг от друга в полинуклеотидной цепи элементам вторичной структуры рибосомных РНК. Можно думать, что эти взаимодействия в значительной мере индуцированы рибосомными белками, активно влияющими на конформацию РНК в рибосомах.

Авторы приносят благодарность Т. Быстровой и А. Ишутиной за помощь при получении субчастиц рибосом и П. Калмыкову за содействие в проведении опытов на аналитической ультрацентрифуге.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
5 IV 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. С. Спири́н, Л. А. Киселев и др., Биохимия, т. 28, 920 (1963). ² И. Н. Шатский, Н. В. Чичкова, А. А. Богданов, Молек. биол., т. 5, 149 (1971). ³ С. А. Нехорошев, Е. К. Прессман и др., Биохимия, т. 36, 580 (1971). ⁴ Т. А. Bickle, J. W. Hershey, R. R. Traut, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 69, 1327 (1972). ⁵ Ф. К. Кричфилд, Анализ основных функциональных групп в органических соединениях, М., «Мир», 1965, стр. 96. ⁶ U. C. Lutter, C. G. Kurland, G. Stöffler, FEBS Letters, v. 54, 144 (1975). ⁷ A. Sommer, R. R. Traut, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 71, 3940 (1974). ⁸ G. W. Tischendorf, H. Zeiehardt, G. Stöffler, ibid., v. 72, 4820 (1975). ⁹ H. G. Wittmann, B. Wittmann-Liebold, The Ribosomes, 1974, p. 115. ¹⁰ А. С. Спири́н, Л. П. Гаврилова, Рибосома, М., «Наука», 1971, стр. 110.