



УДК 577.323.435

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА 5'-КОНЦЕВОГО 5,3S  
ФРАГМЕНТА 18S РИБОСОМНОЙ РНК ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

Нейлин М.У., Нигул А.И., Тоотс П.Э., Саарма М.Ю.

*Лаборатория молекулярной генетики, Институт химической  
и биологической физики Академии наук ЭССР, Тарту, Таллин*

Рибосомы эукариот содержат четыре молекулы РНК — 28S, 18S, 5,8S и 5S рРНК [1]. Недавно Сзабо с соавт. [2] сообщили о выявлении новой низкомолекулярной 5,3S РНК в рибосомных 40S субчастицах млекопитающих. Выяснилось, что в действительности 5,3S РНК является 5'-концевым фрагментом 18S рРНК, который образуется при диссоциации рибосомных субчастиц [3]. Мы исследовали вторичную структуру 5,3S фрагмента РНК рибосом печени крысы и его взаимодействие с рибосомными белками. При электрофорезе рибосомной РНК из 40S субчастиц печени крысы или клеток HeLa в 10% полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины выявляются два дискретных фрагмента РНК длиной ~110 и 140 нуклеотидов (рис. 1). Из опыта в опыт их количество, а также их соотношение варьирует (рис. 1, 3—5). Они условно обозначены 4,7S и 5,3S РНК соответственно. Оба фрагмента были элиминированы из полиакриламидного геля и помечены [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ при помощи Т4-полинуклеотидкиназы. Результаты показывают, что 4,7S фрагмент РНК метится [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ хорошо, а 5,3S РНК не метится. Пометить оба фрагмента РНК с 3'-конца  $^{32}$ рСр при помощи Т4-РНК-лигазы не удалось. Полученный результат показывает, что у 5,3S РНК оба конца полинуклеотидной цепи фосфорилированы, а у 4,7S РНК фосфорилирован только 3'-конец. Это свидетельствует о том, что 4,7S РНК и 5,3S РНК — не индивидуальные молекулы РНК, а фрагменты 18S рРНК. Наличие же фосфатного остатка на 5'-конце 5,3S РНК указывает на ее происхождение из 5'-конца 18S РНК.

Определение нуклеотидной последовательности \* 5,3S РНК показывает (рис. 2), что она является 5'-концевым фрагментом 18S РНК длиной 134—136 нуклеотидов, а 4,7S РНК в свою очередь является фрагментом 5,3S РНК, где отщиплены 27—28 нуклеотидов с 5'-конца полинуклеотидной цепи (рис. 2). Последовательность 5,3S РНК, определенная нами (рис. 2), совпадает с ранее известной последовательностью 5'-конца 18S РНК крысы и кролика, а также с последовательностью гена 18S РНК рибосом печени крысы [4—7].

Если выделить 18S РНК прямо из клеток или полисом, то образования 5,3S и 4,7S фрагментов практически не наблюдается. Они образуются только при выделении 18S РНК из рибосомных 40S субчастиц. Следовательно, эндоуклеазная атака происходит во время диссоциации рибосомных субчастиц. Атака фосфодиэфирной связи в районе 135-го нуклеотида происходит раньше, чем атака около 27—28-го нуклеотида, так как 5,3S РНК часто выявляется без 4,7S РНК (рис. 1, 5).

Осуществляя инкубацию 18S РНК, выделенной из 40S субчастиц печени крысы, при разных температурах с последующим гель-электрофорезом в денатурирующих условиях, мы показали, что 5,3S РНК образуется уже при  $10 \pm 3^\circ \text{C}$ . Это указывает на то, что фосфодиэфирная связь 5,3S фрагмента с остальной частью 18S РНК очень слабая. Согласно опубликованным моделям, 5,3S фрагмент связан с остальной частью молекулы приблизительно 20 водородными связями [7, 8], что предсказывает более высокую  $T_m$ , чем найдено нами.

\* Данные не приведены.

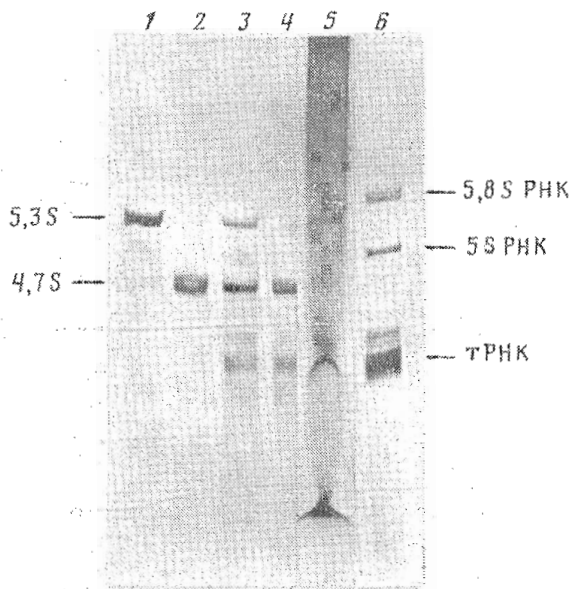


Рис. 1. Электрофорез фрагментов РНК, образующихся при выделении 18S РНК, в 10% ПААГ, содержащем 7 М мочевины: 1—5,3S РНК, 2—4,7S РНК, 3—5—фрагменты, выделяемые из 40S рибосомных субчастиц в различных опытах, 6—маркеры рРНК

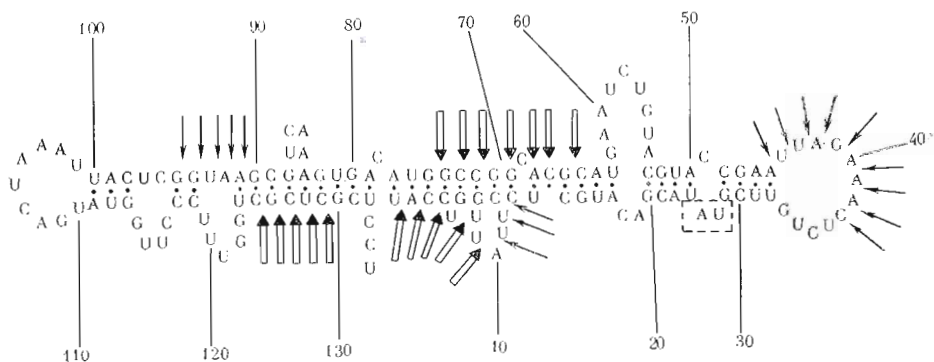


Рис. 2. Вторичная структура 5,3S-фрагмента 18S РНК печени крысы, конструированная при помощи ЭВМ. Обозначены фосфодиэфирные связи, доступные действию  $S_1$ -нуклеазы (черные стрелки) и эндорибонуклеазы яда кобры (светлые стрелки). Пунктиром ограничено место атаки РНКазой при образовании 4,7S РНК

Применение экспресс-метода секвенирования РНК и параллельного действия двух нуклеаз, одна из которых специфически расщепляет однонитевые участки (нуклеаза  $S_1$ ), а другая — двуспиральные участки (эндорибонуклеаза из яда кобры), дает возможность оценить вторичную структуру 5,3S РНК [9—11], 5,3S фрагмент РНК дефосфорилировали, затем метили с 3'-конца  $^{32}\text{P}$  или с 5'-конца  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и анализировали с помощью нуклеаз. Результаты, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что участки 10—12, 36—45, 90—95 атакуются  $S_1$ -нуклеазой, а участки 1—10, 65—75 и 125—130 — эндорибонуклеазой яда кобры. Данные по образованию 5,3S РНК и результаты нуклеазного теста указывают на то, что 5,3S РНК имеет выраженную вторичную структуру и, по всей вероятности, образует самостоятельную структурную единицу 18S РНК.

Для дальнейшего изучения вторичной структуры 5,3S РНК мы провели компьютерный анализ структуры 5,3S РНК при помощи оригинальной программы, написанной нами для микрокомпьютера «Apple II». Эта программа является интерактивной и позволяет ввести в расчеты вторич-

ных структур РНК полученные экспериментальные данные. В случае 5,3S фрагмента модель была рассчитана на основании минимальных свободных энергий шпилек РНК и на основании доступности нуклеотидов к действию S<sub>1</sub>-нуклеазы и эндорибонуклеазы из яда кобры. Модель, генерируемая компьютером (рис. 2), хорошо согласуется с данными нуклеазного теста и еще раз указывает на то, что 5,3S фрагмент 18S РНК может образовывать самостоятельный домен.

Можно предположить, что в составе 18S РНК фрагмент 5,3S имеет другую структуру, чем в виде отдельной молекулы. На такую возможность, т. е. на большое изменение структуры рибосомной РНК после гидролиза единственной фосфодиэфирной связи, указывает работа Эндо и Вул по гидролизу 28S рРНК  $\alpha$ -сарцином [12]. Однако атака  $\alpha$ -сарцина сопровождается полным ингибированием биосинтеза белка, а расщепление фосфодиэфирной связи с образованием 5,3S РНК не имеет таких последствий. Это обстоятельство противоречит высказанному предположению.

Возможность существования самостоятельного 5,3S РНК-домена побудила нас исследовать взаимодействие рибосомных белков с этим фрагментом РНК. Для этого мы пришивали 5,3S фрагмент к эпокси-сефарозе за 3'-конец полинуклеотидной цепи по методике, описанной нами ранее [13]. Через колонку с иммобилизованной 5,3S РНК пропускали суммарные белки 40S и 60S рибосомных субчастиц печени крысы (СБ40 и СБ60 соответственно в условиях работы). Результаты трех независимых опытов показали, что колонки с иммобилизованной 5,3S РНК не связывают рибосомных белков. Таким образом, кажется вероятным, что 5'-концевой 5,3S фрагмент 18S РНК печени крысы не является местом связывания рибосомных белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Метспалу А. Х., Саарма М. Ю., Виллемс Р. Л.-Э. В кн.: Биологическая химия. Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, 1981, т. 15, с. 175-233.
2. Szabo P., Pavlovac A., Hamilton M. G. Fed. Proc., 1980, v. 39, № 6, p. 1742.
3. Hamilton M. G., Pavlovac A., Szabo P. Biochim. et biophys. acta, 1983, v. 699, № 3, p. 297-300.
4. Alberty H., Raba M., Gross H. J. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 2, p. 425-434.
5. Azad A. A., Deacon N. J. Nucl. Acids Res., 1980, v. 6, № 12, p. 4365-4376.
6. Lockard R. E., Connaughton J. F., Kumar A. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 11, p. 3445-3457.
7. Chan Y. L., Gutell R., Noller H. F., Wool I. G. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 1, p. 224-230.
8. Rubtsov P. M., Musakhanov M., Zakharyev V. M., Krayev A. S., Skryabin K. G., Bayev A. A. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 12, p. 5779-5794.
9. Слезя М. А., Устав М. Б., Лунд А. Я., Саарма М. Ю. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1877-1880.
10. Toots I., Metspalu A., Villems R., Saarma M. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 20, p. 5331-5343.
11. Toots I., Misselwitz R., Böhm S., Welfle H., Villems R., Saarma M. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 11, p. 3381-3389.
12. Endo Y., Wool I. G. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 15, p. 9054-9060.
13. Metspalu A., Saarma M., Villems R., Ustav M., Lind A. Eur. J. Biochem., 1978, v. 91, № 1, p. 73-81.

Поступило в редакцию 8.IV.1986

#### SECONDARY STRUCTURE OF THE 5,3S RNA FRAGMENT FROM THE 5'-TERMINUS OF 18S RNA OF RAT LIVER RIBOSOMES

NEILIN M. V., NIGUL A. I., TOOTS I. E., SAARMA M. J.  
Institute of Chemical Physics and Biophysics, Academy of Sciences  
of the Estonian SSR, Tartu, Tallinn

Two small RNA fragments, 5,3S and 4,7S, were observed in gel electrophoretic analysis of RNA of the 40S ribosomal subunit of rat liver. 5,3S RNA (134-136 nucleotides long) proved to be 5'-terminal fragment of 18S ribosomal RNA, whereas 4,7 RNA is the degradation product of 5,3S RNA with 27-28 5'-terminal nucleotides lost. The secondary structure of 5,3S RNA was probed with two structure-specific nucleases, S<sub>1</sub> nuclease and the double-strand specific cobra venom endoribonuclease. The nuclease digestion data agree well with the computer generated secondary structure model for 5,3S RNA. This model predicts that the 5'-terminal part of rat liver ribosomal 18S RNA forms an independent structural domain. The affinity chromatography experiments with the immobilized 5,3S fragment show that 5,3S RNA does not bind rat liver ribosomal proteins.