



УДК 547.962.04

ИЗУЧЕНИЕ РНК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В 50S
СУБЧАСТИЦЕ РИБОСОМ *E. COLI* С ПОМОЩЬЮ
УФ-ИНДУЦИРОВАННЫХ РНК-БЕЛКОВЫХ СШИВОК

Пивазян А. Д., Чиркова Е. Ю., Турчинский М. Ф.,
Будовский Э. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Ультрафиолетовое (λ 254 нм) облучение 50S субчастиц рибосом *E. coli* (дозы до 4 квантов на нуклеотид) приводит к образованию ковалентных сшивок между рибосомными РНК и белками L2, L4, L6, L8, L10, L11, L13, L14+L18+L23, L21+L14, L25+L29, L30. При таких дозах облучения субчастицы сохраняют более чем 80% пептидилтрансферазной активности в модельной системе.

Образование УФ-индуцированных полинуклеотид-белковых сшивок — в настоящее время наиболее надежный метод определения и исследования полинуклеотид-белковых контактов [1, 2]. Его важнейшим свойством является возможность зафиксировать полинуклеотид-белковые взаимодействия, существующие в нуклеопротеидах, практически при любых условиях. Метод был использован для изучения контактов вирусных нуклеиновых кислот с белками вириона [3], субъединиц РНК-полимеразы с ДНК [4], тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазами [5] и т. д. Применение этого метода для исследования структуры рибосом [6–8] и рибосомных комплексов [9, 10] позволило определить фрагменты 16S РНК, контактирующие с белками S4 [10], S7 [11], показать, что ряд так называемых сплит-белков из 30S субчастиц рибосом *E. coli* непосредственно контактирует с 16S РНК [12], определить белки, контактирующие с тРНК в А- и Р-сайтах рибосомы [13], показать изменения РНК-белковых контактов в 30S субчастице рибосом *E. coli*, происходящие при присоединении к последней фактора инициации IF-3 [14].

В настоящей работе мы провели идентификацию белков, контактирующих с рибосомными РНК в составе 50S субчастицы рибосом *E. coli*, и показали, что использованные дозы УФ-облучения сравнительно мало влияют на пептидилтрансферазную активность 50S субчастиц.

Образование РНК-белковых сшивок под действием УФ-облучения может дать достоверную картину об РНК-белковых контактах лишь в том случае, если используемые дозы облучения не вызывают нарушения высшей структуры этих частей. Ранее было показано, что 50S субчастицы более чувствительны к УФ-облучению, чем 30S субчастицы рибосом, и при больших дозах поглощенной энергии наблюдаются превращения 50S субчастиц типа «разворачивания», т. е. разрушения их высшей структуры [7].

Таблица 1

Изменение пептидилтрансферазной активности 50S субчастиц в зависимости от дозы облучения по данным переноса Ac-[¹⁴C]Leu с C-A-C-C-A-Leu-Ac на пуromицин *

Доза облучения, квант/нуклеотид	Выход ацетиллейцилпуromицина		Потеря активности, %
	имп/мин	% от введенного C-A-C-C-A-Leu-Ac	
0	2732	30	0
1	2508	27	3
2	2280	25	17
4	2158	24	21
12	1680	18	39

* Приведены результаты типичного опыта.

Поэтому в качестве первого этапа мы определили тот интервал доз УФ-облучения, который приводит к достаточно большой степени образования РНК-белковых сшивок, но еще не вызывает заметных нарушений высшей структуры 50S субчастиц. При поглощении вплоть до 6 квантов на нуклеотид в профиле седиментации 50S субчастиц не наблюдается изменений и только начиная с доз, больших чем 10 квантов на нуклеотид, появляется материал с меньшей константой седиментации.

Для функциональной характеристики 50S субчастиц в качестве модельной системы использовали перенос аминокислотного остатка с C-A-C-C-A-Leu-Ac на пуromицин [15], что отражает способность 50S субчастиц к связыванию пептидил-тРНК и активность пептидилтрансферазного центра.

Как видно из табл. 1, при дозах ~5 квантов на нуклеотид транспептидация в этой системе уменьшается не более чем на 20%. Следовательно, при таких дозах УФ-индуцируемые РНК-белковые сшивки можно считать возникающими в составе нативных 50S субчастиц.

Метод идентификации рибосомных белков, ковалентно сшивающихся с РНК при УФ-облучении рибосом, был описан нами ранее [16]. Он состоит в том, что после облучения рибосомные субчастицы гидролизуют смесью нуклеаз и полученный гидролизат, содержащий как свободные белки, так и белки, ковалентно связанные с фрагментами олигонуклеотидов, разделяют двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле. При этом в первом направлении (при pH 4,5) наличие олигонуклеотидных фрагментов замедляет движение белков, а во втором направлении (в присутствии додецилсульфата натрия) не влияет на их подвижность. Положение в геле белков, содержащих ³²P-меченые олигонуклеотидные фрагменты, можно определить автордиографией. Сравнивая положение свободных белков, окрашенных кумасси, с автордиограммой, можно предварительно идентифицировать белки, сшивающиеся с 23S РНК и 5S РНК при облучении 50S субчастиц. Сопоставление радиоактивности во всех участках геля (что отражает количество и размер фрагментов [³²P]РНК, связанных с соответствующими белками) позволяет оценить относительную эффективность образования сшивок РНК с различными белками. Хотя, по литературным данным [7, 8], при УФ-облучении 50S субчастиц рибосом *E. coli* с РНК сшиваются практически только два белка, L2 и L4, в наших условиях радиоактивная в соответствующих участках геля не превышает одной трети, а остальная радиоактивность сосредоточена в участках, соответствующих еще 9-13 белкам (табл. 2). Как и следовало ожидать, изменение функционального состояния 50S субчастицы вызывает такое изменение РНК-белковых контактов, которое может быть обнаружено с помощью этого метода (будет опубликовано отдельно).

Белки 50S субчастиц рибосом *E. coli*, ковалентно связывающиеся с 23S и 5S [³²P]РНК при УФ-облучении 50S субчастиц (3,0 квант/нуклеотид)

Белки 50S субчастиц	% от общего количества ³² P в белках	Белки 50S субчастиц	% от общего количества ³² P в белках	Белки 50S субчастиц	% от общего количества ³² P в белках
L2	10±2	L10	3±1	L21+L14	3±1
L4	21±1	L11	6±1	L25+L29	4±1
L6	7±2	L13	8±2	L30	4±1
L8	7±1	L24+L18+L23	18±3		

Примечание. Общая радиоактивность участков геля, содержащих меченые белки, составляла 4–6·10⁴ имп/мин, не считая участка, содержащего агрегаты. Средний фон геля 50 имп/мин.

Следует отметить, что среди белков, пришивающихся к РНК при УФ-облучении 50S субчастиц (табл. 2), четыре (L2, L4, L6, L11) входят в состав пептидилтрансферазного центра [17]. Из них L2 и L6 могут сшиваться и, таким образом, контактировать с тРНК, находящейся в А-сайте рибосом *E. coli* [13]. Следовательно, белки L4 и L6 имеют по крайней мере два участка, контактирующих с РНК, а белок L2 — три.

Экспериментальная часть

В работе использовали N,N'-метиленабисакриламид, акриламид, трис-(оксиамино)метан, β-аланин, тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония, уридин (Reanal, Венгрия); детергенты Brij-58 и додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), лизоцим (Sigma, США), РНКазы А и T₁ (Worthington, США), хлоргидрат пурамицина (Calbiochem, США), бактотриптон (Difco, США), 2-меркаптоэтанол (Merck, ФРГ), H₃³²PO₄ (Amersham, Англия). Остальные реактивы («Союзреактив», СССР) имели квалификацию х.ч. и ос.ч. Немеченые 50S субчастицы рибосом *E. coli* и 2'(3')-N-ацетиллейцилпентануклеотид С-А-С-С-А-[¹⁴C]Leu-As были любезно предоставлены соответственно С. В. Кирилловым (ЛИЯФ, Ленинград) и А. В. Косенюком (ИМБ АН СССР, Москва)

Получение ³²P-меченых 50S субчастиц рибосом. Клетки *E. coli* MRE 600 выращивали по методу [18] до средней логарифмической фазы роста ($D_{1,0}^{550}$ 0,5) в присутствии H₃³²PO₄ (0,04–0,08 мКи/мл), промывали буфером, содержащим 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 100 мМ NH₄Cl и 10 мМ MgCl₂, суспендировали в 8 мл буфера (5 мМ трис-НСl, рН 7,4; 60 мМ NH₄Cl; 6 мМ MgCl₂), содержащего 50 мг/мл лизоцима, осаждали центрифугированием (10 000 об/мин, 10 мин), осадок быстро замораживали (ацетон, сухой лед) и оттаивали, добавляли еще 0,2 мл буфера, инкубировали при 4° С 10 мин и снова замораживали и оттаивали. Для экстракции рибосом добавляли 4 мл того же буфера, содержащего 0,5% Brij-58, и перемешивали 10 мин при 4° С, добавляли ДНКазу до концентрации 20 мкг/мл и инкубировали 10 мин при 4° С. Суспензию осветляли центрифугированием (17 000 об/мин, 30 мин). Рибосомы осаждали из супернатанта центрифугированием (центрифуга Beckman L-5-50, ротор SW-50, 49 000 об/мин, 2 ч, 4° С). Осадок рибосом суспендировали в 1 мл буфера (20 мМ трис-НСl, рН 7,4; 200 мМ NH₄Cl; 1 мМ MgCl₂; 6 мМ 2-меркаптоэтанол) и диализовали против того же буфера 16 ч при 4° С.

Субчастицы разделяли центрифугированием (центрифуга Beckman L-5-50, ротор SW-40, 39 000 об/мин) в сахарозном градиенте (10–30%), приготовленном на том же буфере. Фракцию 50S субчастиц осаждали 0,7 объемами этанола, предварительно повысив концентрацию MgCl₂ до 10 мМ. Осадок 50S субчастиц ресуспендировали в буфере для облучения: 10 мМ трис-НСl, рН 7,4; 200 мМ NH₄Cl; 20 мМ MgCl₂; 6 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA (буфер А). Полученные 50S субчастицы содержали

полный набор белков по данным двумерного электрофореза в полиакриламидном геле по методу Кальтшмита — Витмана [19]. Они давали один пик при центрифугировании в сахарозном градиенте (10–30%) в буфере А и в течение недели после выделения содержали недеградированные 23S и 5S РНК по данным центрифугирования в сахарозном градиенте (5–20%), приготовленном на буфере 10 мМ трис-НСl, рН 7,4; 100 мМ NH₄Cl, 2,5 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфат натрия. Удельная активность составляла 3–15·10⁷ имп/мин на 1 ОЕ₂₆₀ рибосом.

Облучение 50S субчастиц. 50S субчастицы (как ³²P-меченые, так и немеченые) в буфере А (концентрация 10 ОЕ₂₆₀/мл) помещали в чашку Петри диаметром 2,5–5,5 см и облучали при 4° С с перемешиванием полным светом ртутной лампы низкого давления (БУВ-15). Интенсивность падающего света, определенная по уридиновому актинометру [20], составляла 2,7·10¹⁶ квант/см²·мин. Поскольку оптическая плотность облучаемых растворов была больше 1 ОЕ на оптический путь, предполагали, что излучение полностью поглощается раствором. В ходе облучения отбирали аликвоты растворов 50S субчастиц и определяли профиль седиментации в сахарозном градиенте.

Анализ пептидилтрансферазной активности облученных 50S субчастиц [15]. Немеченые 50S субчастицы, облученные и необлученные, в количестве 30–50 пмоль (1–2 ОЕ₂₆₀) растворяли в 200 мкл буфера, содержащего 20 мМ MgCl₂, 200 мМ NH₄Cl, 40 мМ трис-НСl (рН 7,4), 1 мМ пуромицин, 8–13 пмоль С-А-С-А-¹⁴C]Leu-Ас (5600–9100 имп/мин, уд. акт. 330 мКи/μмоль) и 50% метанол, добавляемый для начала реакции. После инкубации в течение 8–10 мин при 0° С реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2М NaOH и смесь выдерживали 45 мин при 40° С (для гидролиза метилового эфира ацетиллейцина). Образовавшийся ацетиллейцилпуромицин экстрагировали 3 мл этилацетата. Этилацетат промывали 0,5 мл Н₂O, сушили безводным Na₂SO₄ и в аликвотах по 1,5 мл определяли радиоактивность (сцинтиллятор «Unisolw», Англия).

Идентификация белков 50S субчастицы рибосом E. coli, ковалентно пришивающихся к рРНК. Облученные ³²P-меченые субчастицы рибосом осаждали этанолом, осадок растворяли в 50 мкл буфера (5М мочевины, 4 мМ EDTA, 40 мМ трис-НСl, рН 7,4), добавляли РНКазу А (20 мкг/5 ОЕ₂₆₀) и T₁ (100 ед. акт./ОЕ₂₆₀) и инкубировали 12–15 ч при 37° С. Гидролизат подвергали двумерному электрофорезу в полиакриламидном геле в модифицированной системе Меца — Богорада [21], как было описано ранее [16]. После окрашивания кумасси R-250 пластину геля помещали в полиэтиленовый пакет и радиоавтографировали (пленка РТ-1 или РМ-1). Идентификацию белков, содержащих пришитые ³²P-меченые олигонуклеотидные фрагменты, проводили сравнением положения окрашенных белков и радиоактивных участков геля, как было описано ранее [16]. Радиоактивные участки геля извлекали и определяли в них радиоактивность после инкубации в сцинтилляционной жидкости Unisolw в течение 2–3 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith K. C. (1976) in: Aginy, Carcinogenesis and Radiation Biology (K. C. Smith, ed.), pp. 67–83, Plenum Press, New York–London.
2. Protein crosslinking (1977) Adv. in Experimental Medicine and Biology, vol. 86A, Plenum Press, New York–London.
3. Budowsky E. I., Simukova N. A., Turchinsky M. F., Bony I. V., Skoblov Yu. M. (1976) Nucleic Acid Res., 3, 261–276.
4. Markovitz A. (1972) Biochim. et biophys. acta, 281, 522–534.
5. Schimmel P. R., Budzik G. P., Lam S. S. M., Schoemacher H. J. P. (1976) in: Aginy, Carcinogenesis and Radiation Biology (K. C. Smith, ed.), pp. 123–148, Plenum Press, New York–London.
6. Gorelic L. (1975) Biochim. et biophys. acta, 390, 209–225.
7. Möller K., Brimacombe R. (1975) Mol. Gen. Genet., 141, 343–355.
8. Baca O. G., Bodely J. W. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 70, 1091–1096.

9. Ehresmann B., Reinbolt J., Beckendorf C., Tretsch D., Ebel J. P. (1976) FEBS Lett., 67, 316—319.
10. Ehresmann B., Beckendorf C., Ehresmann C., Ebel J. P. (1977) FEBS Lett., 78, 261—266.
11. Zwieb Ch., Brimacombe R. (1978) Nucleic Acids Res., 5, 1185—1206.
12. Turchinsky M. F., Broude N. E., Kussowa K. S., Abdurashidova G. G., Muchamedganova E. N., Schatsky I. N., Bystrova T. F., Budowsky E. I. (1978) Eur. J. Biochem., 90, 83—88.
13. Абдурашидова Г. Г., Турчинский М. Ф., Салихов Т. А., Асланов Х. А., Будовский Э. И. (1978) Биоорг. химия, 4, 982—983.
14. Броуде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. (1978) Биоорг. химия, 4, 1687—1689.
15. Monro R. E. (1967) Nature, 223, 903—905.
16. Турчинский М. Ф., Броуде Н. Е., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Будовский Э. И. (1977) Биоорг. химия, 3, 1013—1019.
17. Краевский А. А., Куханова М. К., Готтих Б. П. (1977) Пептидилтрансферазный центр рибосомы (Р. М. Хомутов, ред.), ВИНТИ, М.
18. Felner P. (1969) Eur. J. Biochem., 11, 12—27.
19. Kaltschmidt E., Wittmann H.-G. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 1276—1282.
20. Wang S. Y. (1962) Photochem. Photobiol., 1, 135—145.
21. Metz L. Y., Bogorad L. (1974) Analyt. Biochem., 57, 200—210.

Поступила в редакцию
23.IV.1979

**A STUDY OF THE RNA-PROTEIN INTERACTIONS
IN 50S SUBUNITS OF *E. COLI* RIBOSOMES BY THE METHOD
OF UV-INDUCED RNA-PROTEIN CROSSLINKS**

PIVAZYAN A. D., CHIRKOVA E. Yu., TURCHINSKY M. F., BUDOWSKY E. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

UV-irradiation (λ 254 nm) of 50S subunits of *E. coli* ribosomes has been shown to cause covalent crosslinks between ribosomal RNAs and proteins L2, L4, L6, L8, L10, L11, L13, L24+L18+L23, L21+L14, L25+L29, L30. The irradiated 50S ribosomal subparticles preserve more than 80% of peptidyltransfer activity in a model system.