



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.96.04

СВЯЗЫВАНИЕ 30S СУБЧАСТИЦ РИБОСОМЫ КОМПЛЕКСАМИ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ тРНК 5S РНК С БЕЛКАМИ 50S
РИБОСОМНОЙ СУБЧАСТИЦЫ *ESCHERICHIA COLI*

Метспапу Э.Э., Устаф М.В.

Тартуский государственный университет

Виллемс Р.Л.-Э.

Институт химической и биологической физики Академии наук ЭССР, Тарту

Структурные основы взаимодействия двух рибосомных субчастиц остаются одной из важнейших проблем функциональной топографии рибосом. Участие тех или иных рибосомных белков в этом процессе было изучено с помощью метода химической модификации и селективным удалением белков, а также блокировкой ассоциации субчастиц антителами (см. обзор [1]). Более поздние исследования выявили потенциальную роль некоторых участков 16S РНК во взаимодействии малой субчастицы с 50S партнером [2], а метод сшивания белков с РНК показал, что ряд белков как 30S, так и 50S субчастиц находится на близком расстоянии или в контакте с рРНК противоположной субчастицы [3, 4].

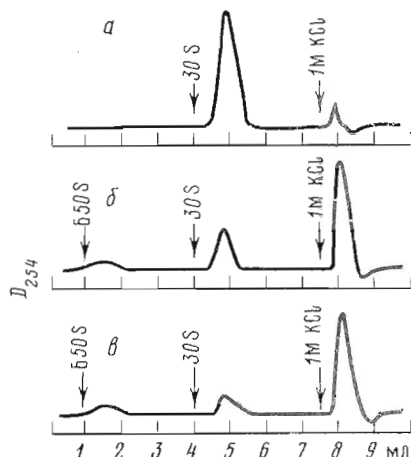
Ниже мы покажем, что пространственно организованный ассоциат из компонентов 50S субчастицы (не включающий 23S РНК) способен взаимодействовать с 30S субчастицей.

На рисунке (а) представлена хроматограмма 30S субчастиц на геле сефарозы с иммобилизованной тРНК. Кодон-независимого взаимодействия тРНК с 30S субчастицей [5] явно недостаточно для образования стабильного комплекса в условиях нашего эксперимента. Пропускание же 30S субчастицы через колонку, где на иммобилизованной тРНК был сформирован комплекс с белками 50S субчастицы, приводило к образованию тройного комплекса (рисунок, б). Аналогично 30S субчастица рибосомы взаимодействовала и с комплексом, образованным между 5S РНК и белками 50S субчастицы (рисунок, в).

Оба тройных комплекса стехиометричны, так как максимальное связывание 30S субчастицы приблизительно соответствует (0,7–0,8 : 1) теоретическому количеству комплекса тРНК — белки 50S субчастицы (или 5S РНК — белки 50S субчастицы), вычисленному из мольного количества белков 50S субчастицы в эксперименте с учетом того, что в условиях опыта все белки комплекса действительно связываются на РНК-сефарозе.

В условиях эксперимента в состав комплекса тРНК — белки 50S субчастицы входят белки L2, L15, L16, L17, L18, L22, L26 и L33, а в комплекс, образованный 5S РНК и белками 50S субчастицы, — еще и белки L5 и L25 [6, 7]. Значительное перекрытие комплексов говорит о возможном сход-

Аффинная хроматография 30S субчастиц рибосомы *E. coli* на геле сефарозы с иммобилизованной тРНК (а), иммобилизованным комплексом тРНК — белки 50S субчастицы (б) и иммобилизованным комплексом 5S РНК — белки 50S субчастицы (в). Объем геля 0,3 мл, концентрация тРНК в геле — 2,5 мг/мл, концентрация 5S РНК — 1,8 мг/мл геля. Хроматографию проводили в 0,01 М трис-НСl-буфере, рН 7,5, содержащем 0,01 М MgCl₂, 0,1 М KCl и 6 мМ 2-меркаптоэтанол. На гель наносили 0,1 мг 30S субчастиц (4 мг/мл) и 0,5 мг белков 50S субчастицы (0,25 мг/мл). Места соответствующих нанесений (30S и 550S) и место элюции 1 М KCl отмечены стрелками



стве основных механизмов связывания 30S субчастицы с данными комплексами.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными работ [3, 4], согласно которым белки L2, L5, L15, L16, L17 и L18, содержащиеся в тРНК-белкового и/или 5S РНК-белковом комплексе, могут быть *in situ* сшиты с 16S РНК.

Отличительной особенностью настоящих экспериментов является отсутствие в них 23S РНК. Таким образом, впервые в «чистом виде» установлено, что определенные белки большой субчастицы рибосомы, организованные в форме специфического РНК-белкового комплекса, содержат область 50S субчастицы, достаточную для связывания 30S субчастицы. Согласно интерпретации, данной в работах [6, 7], эти белки 50S субчастицы представляют собой компоненты лептидилтрансферазного центра рибосомы.

5S РНК и тРНК были ковалентно иммобилизованы на эпоксиактивированной сефарозе 2В через дигидразид адипиновой кислоты, как это описано ранее [8]. Нами было показано [6, 8, 9], что в условиях эксперимента неспецифической сорбции белка и РНК на носителе не наблюдается. Носитель также не сорбирует рибосомных субчастиц (см. рисунок, а).

Количественное определение связанных на тРНК- и 5S РНК-сефарозе белков и двумерный анализ состава комплекса описаны в работах [6, 9, 10].

Преформирование РНК-белковых комплексов проводили аналогично описанному в работе [11]. Мольное количество преформированных комплексов белков 50S субчастицы с тРНК и 5S РНК вычисляли, учитывая, что суммарная молекулярная масса белков 50S субчастицы рибосомы равна $5,2 \cdot 10^5$. Поскольку преформирование комплекса было проведено в условиях, при которых все белки 50S субчастицы, принадлежащие к РНК-белковым комплексам (см. выше), были количественно связаны РНК-сефарозой, мольное количество этого комплекса считали равным мольному количеству белков 50S субчастицы, нанесенному на аффинный сорбент. О насыщении преформированных РНК-белковых комплексов с 30S субчастицей судили на основе титрования постоянного количества комплекса возрастающим количеством субчастиц, измеряя оптически несвязанную и связанную фракции 30S субчастиц. 1 мг 30S субчастиц принимали равным $1,07 \cdot 10^{-9}$ моль [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Traut R. R., Heimark R. L., Sun T.-T., Hershey J. W. B., Bollen A. Protein topography of ribosomal subunits from *Escherichia coli*.— In: Ribosomes (Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., eds). N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 271–308.
2. Herr W., Chapman N. M., Noller H. F. Mechanism of ribosomal subunit association:

- discrimination of specific site in 16S RNA essential for association activity.— *J. Mol. Biol.*, 1976, v. 130, p. 433–436.
3. *Bäumert H. G., Sköld S.-E., Kurland C. G.* RNA-protein neighbourhoods of the ribosome obtained by crosslinking.— *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 89, p. 353–359.
 4. *Абдурашидова Г. Г., Пивазян А. Д., Турчинский М. Ф., Будовский Э. И.* Изменение РНК-белковых взаимодействий при ассоциации 50S и 30S субчастиц рибосом *E. coli*.— *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 4, с. 626–628.
 5. *Grajevskaja R. A., Odintsova V. B., Saminsky E. M., Bresler S. E.* Interaction of transfer RNA with the 30S subunits of ribosomes in the absence of messenger.— *FEBS Lett.*, 1973, v. 33, p. 11–14.
 6. *Ustav M., Villems R., Saarma M., Lind A.* The interaction of transfer ribonucleic acid with 50S ribosomal subunit proteins.— *FEBS Lett.*, 1977, v. 83, p. 353–356.
 7. *Villems R., Koger A., Lind A., Maimets T., Metspalu E., Saarma M., Sarapu T., Ustav M.* Affinity chromatography of *Escherichia coli* ribosomal proteins on the immobilized ribonucleic acids: properties of the complexes.— In: *Biological implications of protein-nucleic acid interactions* (Augustyniak J., ed.). Amsterdam – New York – Oxford: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980, p. 91–100.
 8. *Устав М. Б., Виллемс Р. Л.-Э., Ремме Я. Л., Линд А. Я.* Новый эффективный метод иммобилизации рибонуклеиновых кислот и нуклеотидов на агарозе.— *Биоорган. химия*, 1979, т. 5, № 3, с. 365–369.
 9. *Ustav M., Villems R., Lind A.* The interaction of transfer ribonucleic acid with 30S ribosomal subunit proteins.— *FEBS Lett.*, 1977, v. 82, p. 259–262.
 10. *Howard G. A., Traut R. R.* A modified two-dimensional gel system for the separation and radioautography of microgram amounts of ribosomal proteins.— In: *Methods in enzymology* (Moldave K., Grossmann L., eds). New York – London: Academic Press, 1974, v. 30, part F, p. 526–539.
 11. *Villems R., Saarma M., Metspalu A., Toots I.* New aspects of the eukaryotic ribosomal subunit interaction.— *FEBS Lett.*, 1979, v. 107, p. 66–68.
 12. *Tissieres A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingworth B. R.* Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*.— *J. Mol. Biol.*, 1959, v. 1, p. 224–229.

Поступила в редакцию
9.IX.1980

COMPLEXES OF IMMOBILIZED tRNA AND 5S RNA WITH 50S RIBOSOMAL SUBUNIT PROTEINS BIND 30S SUBUNIT OF *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOME

METSPALU E. E., USTAV M. B., VILLEMS R. L.-E.

Tartu State University, Tartu; Institut of Chemical and Biological Physics, Academy of Sciences of the Estonian SSR, Tartu

tRNA and 5S RNA were covalently bound to Sepharose. It was shown that these RNAs in the complex with *E. coli* 50S ribosomal subunit proteins are capable of binding the smaller ribosomal subunit in the absence of 23S RNA.