



УДК 577.323.4 : 577.152.314'143

ИССЛЕДОВАНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ СОМАТИЧЕСКОЙ
И ООЦИТНОЙ 5S рРНК ВЬЮНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СТРУКТУРНО-СПЕЦИФИЧЕСКИХ НУКЛЕАЗ*Серенкова Т. И., Мазо А. М., Машкова Т. Д.,
Тимофеева М. Я.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

С использованием ферментативных методов исследована вторичная структура соматической и ооцитной 5S рРНК вьюна. Меченую ^{32}P по 5'-концу соматическую и ооцитную 5S рРНК подвергали ограниченному гидролизу структурно-специфическими РНКазами S1, T1 и нуклеазой из яда кобры. Результаты гидролиза показали, что во вторичной структуре соматической и ооцитной 5S рРНК имеются различия, которые локализованы в 5'-половине молекулы (область с 5-го по 65-й нуклеотид).

Наличие у одного организма нескольких видов 5S рРНК, различающихся по небольшому числу замен в первичной структуре, показано как для прокариот, так и для эукариот [1]. Ранее авторами этой статьи было установлено, что у вьюна (*Misgurnus fossilis* L.), так же как и у амфибий [2], существуют два типа 5S рРНК — соматическая (MFS-5S рРНК из печени и других соматических тканей) и ооцитная (MFO-5S рРНК — из неоплодотворенной икры). Обе эти 5S рРНК имеют одинаковую длину (120 нуклеотидов), но различаются по нуклеотидной последовательности в шести положениях [3].

Из сравнения известных первичных структур 5S рРНК видно, что эти последовательности высококонсервативны. На основании этого, а также исходя из общей роли в функционировании рибосомы 5S рРНК, можно предположить, что и структурные свойства этих молекул тоже консервативны. В настоящее время предложено несколько моделей вторичной структуры 5S рРНК, основанных на результатах исследований разными методами: физическими [4], ферментативными [5], компьютерного анализа [6] и т. д. Предложенные модели имеют ряд общих признаков или похожих структурных элементов. Авторы моделей пытаются дать функциональное обоснование некоторым общим структурным элементам. Предполагается, например, что у прокариотических 5S рРНК в петлевом участке с 40-го по 44-й нуклеотид может происходить взаимодействие с тРНК [7], а высококонсервативная последовательность 3'-половины молекулы 5S рРНК прокариот и эукариот образует в рибосоме комплекс с рибосомными белками [8]. Следует отметить, что при обнаружении в одном организме у рыб [9], амфибий [2], курицы [10] двух или нескольких различающихся по последовательности типов 5S рРНК авторы не обсуждают возможность каких-либо соответствующих изменений во вторичной структуре этих молекул.

В данной работе исследовалась вторичная структура соматической и ооцитной 5S рРНК вьюна. Меченую ^{32}P по 5'-концу соматическую и ооцитную 5S рРНК подвергали ограниченному гидролизу структурно-специфическими РНКазами: S1 и T1, специфическими к односпиральным участкам, и нуклеазой из яда кобры *Naja naja oxiana* (cobra venom endonuclease — CVE), специфической к двуспиральным участкам [5]. Продукты гидролиза анализировали электрофорезом в структурных гелях. Результаты по определению мест расщепления представлены на рис. 1, 2 и в таблице.

Из сравнения мест расщепления РНКазой CVE соматической и ооцит-

Распределение атак нуклеазами S1 и CVE

| Источник 5S рНК | 1—5 | 6—10 | 11—15 | 16—20 | 21—25 | 26—30 | 31—35 | 36—40 | 41—45 | 46—50 |
|-----------------|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|-----------------|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

Нуклеаза S1

| | | | | | | | | | | |
|---|---|-----|--------|--|--------|--|-------|--------|---------------|--------|
| <i>M. fossilis</i> , печень | 5 | 6—8 | | | 24 | | | | 42, 44, 45 | 46—50 |
| <i>M. fossilis</i> , ооциты | 5 | 6—8 | | | 24 | | | | 44—45 | 46—50 |
| Крыса, печень [11] | | | | | | | 33—35 | 36—40 | 41 | |
| <i>B. mori</i> , железа шелкоотдели- тельная [12] | | | | | | | | 37 | | 48, 49 |
| <i>Dictyostelium dis-</i> <i>coideum</i> [12] | | | 11—13 | | 23, 24 | | | 38 | | 48, 49 |
| <i>Saccharomyces ce-</i> <i>revisiae</i> [13] | | | 11, 12 | | | | 33 | 38, 39 | | 50 |
| <i>Halobacterium ha-</i> <i>lobium</i> [14] | | | 12 | | | | | 38—40 | 41, 42 | |

Нуклеаза из яда
кобры (CVE)

| | | | | | | | | | | |
|---|-----|------|----|-------|--------|--------------|--------------|----|----|--------|
| <i>M. fossilis</i> , печень | | 6—8 | 12 | 17—20 | 21, 22 | 27 | 31—33 | | | |
| <i>M. fossilis</i> , ооциты | | 6—8 | 12 | 17—20 | 21, 22 | 27 | 31—33, 35 | 36 | | |
| Крыса, печень [11] | | 7, 8 | | 17—20 | | | | | | 49, 50 |
| <i>B. mori</i> , железа шелкоотдели- тельная [12] | | | 15 | 16—20 | | 26, 28—30 | 31, 32 | | 45 | 46—48 |
| <i>Dictyostelium dis-</i> <i>coideum</i> [12] | 2—5 | | 15 | 16—19 | | | | | | |
| <i>Saccharomyces ce-</i> <i>revisiae</i> [13] | 4 | 6—8 | | 17—20 | 21 | | | | | |
| <i>Halobacterium ha-</i> <i>lobium</i> [14] | 4,5 | 6 | | 17 | | 29 | | | | 50 |

ной 5S рНК видно, что обе 5S рНК имеют практически одинаковое распределение атак. Различия отмечены лишь в районе 35—36-го нуклеотидов (есть расщепление у MFO- и нет у MFS-5S рНК) и в районе 60, 69 и 71-го нуклеотидов. Точки средних и сильных атак сосредоточены в положении 6—8, 17—22, 31—33 и 94—95 (рис. 1, таблица).

Одинаковые места сильных атак РНКазой S1 расположены в районе 44—52-го и слабых — в районе 75, 76 и 100-го нуклеотидов. Основные различия в местах расщепления нуклеазой S1 находятся в области 55—56-го нуклеотидов (есть у MFS- и нет у MFO-5S рНК, таблица).

РНКаза T1 расщепляет обе 5S рНК в области 47—51-го нуклеотидов, что совпадает с положением атак нуклеазой S1. Кроме того, РНКаза T1 расщепляет только MFO-5S рНК в районе 56—65 и 81—87-го нуклеотидов (рис. 1).

Результаты по гидролизу MFS- и MFO-5S рНК структурно-специфическими нуклеазами существенных внутренних противоречий не содержат (рис. 2, таблица). Наиболее доступные области для расщеплений сосредоточены в 5'-половине молекулы, и практически все различия мест расщепления у MFS- и MFO-5S рНК наблюдаются в этой же области, в которой локализованы и замены в первичной структуре. Это дает основание предположить, что вторичные структуры MFS- и MFO-5S рНК различны на

в молекулах 5S рРНК из разных организмов

| | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|
| 51—55 | 56—60 | 61—65 | 66—70 | 71—75 | 76—80 | 81—85 | 86—90 | 91—95 | 96—100 | 101—105 | 106—110 | 111—115 | 116—120 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|

| | | | | | | | | | | | | | |
|------------|--------|--|----|----|-------|--|-------|--------|-----|----------|-----|--|----------|
| 51, 52 | | | | 75 | 76 | | | | | 102, 103 | 110 | | |
| 51, 52, 55 | 56 | | | 75 | 76 | | | | | 102, 103 | 110 | | |
| | | | | 75 | 76—79 | | | | | 101—103 | | | |
| 52, 55 | 56, 57 | | 69 | | | | 88—90 | | 100 | | 109 | | 116—118. |
| 52, 53 | | | | | 76 | | 88 | | | | | | |
| 54 | | | | | | | 90 | 91 | | | | | |
| 54 | | | | | | | | 92, 93 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|----------------|------------|--------|----|-------|--------|--|----|--------|--------|---------|----------|--------------|
| | | | 69 | | | | | | 94, 95 | | | | |
| | 60 | | | 71 | | | | | 94, 95 | | | | |
| 51 | 56, 57 | 61, 62, 64 | 70 | 71 | | 82, 83 | | | 94, 95 | 96 | | | |
| | 57—60 | 61, 62 | | | 78—80 | 81, 84 | | | 94, 95 | 96, 97 | 101—105 | 106, 107 | 111—115 |
| | 56, 57, 59, 60 | | 67, 68 | | 80 | 83 | | 95 | | | | | |
| | 59, 60 | 62 | | | | 82 | | | 96—99 | | | | 114, 115 |
| | 60 | | 69 | | | 85 | | | 97, 98 | | | | 115, 116—119 |

участке последовательности с 5-го по 65-й нуклеотид. Можно думать, что именно этот участок молекулы является нестабильным, способным к изменениям. Возможность такого изменения конформации участка 5'-половины молекулы 5S рРНК обсуждалась в работе Нишикавы и Такемуры [15]. Они предположили, что в предложенной ими обобщенной модели вторичной структуры 5S рРНК участок с 22-го по 57-й нуклеотид может иметь также открытую конформацию. Нестабильность конформации 5'-половины молекулы подтверждается результатами расщепления структурно-специфическими нуклеазами 5S рРНК разных объектов (таблица). Участки, атакуемые нуклеазой S1 у вьюна, *Bombix mori* и *Dictyostelium discoideum*, сосредоточены в области с 42-го по 56-й нуклеотид, а у дрожжей, крысы и *Halobacterium halobium* — с 33-го по 42-й нуклеотид.

Наличие двух разных 5S рРНК, имеющих различную вторичную структуру у вьюна и других видов, вероятно, функционально необходимо, так как в раннем оогенезе ооцитная 5S рРНК накапливается в половой клетке (в ооците) в виде рибонуклеопротеидных частиц в комплексе со специфическим белком — фактором транскрипции РНК полимеразы III [16]. Из этих рибонуклеопротеидных частиц ооцитная 5S рРНК постепенно переходит в образующиеся рибосомы.

Экспериментальная часть

В работе использованы цетилтриметиламмонийбромид — цетавлон (Schuchardt, ФРГ), додецилсульфат натрия — SDS (Serva, ФРГ), дитиотреит (Sigma, США), формамид (Merck, ФРГ), активированный уголь Norit A (Serva, ФРГ), ксиленцианол (BDH, Англия), рентгеновская пленка РТ-1 отечественного производства, реактивы для электрофореза (Reanal, Венгрия), [γ - ^{32}P]АТФ (Институт ядерной физики, Ташкент); рибонуклеаза Т1 (КФ 3.1.4.8) из *Aspergillus oryzae* (Sankyo, Япония), фосфомоноэстераза щелочная из *E. coli* (КФ 3.1.3.1, Worthington, США). Рибонуклеаза S1 (КФ 3.1.4.21) из *A. oryzae*, рибонуклеаза CVE (corba venom endonuclease) из яда среднеазиатской кобры *N. n. oxiana* (КФ 3.1.4.99), полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) из *E. coli*, инфицированной фагом Т4, любезно предоставлены М. Я. Карпейским (ИМБ АН СССР), С. К. Васпленко (ВНИИ молекулярной биологии, Новосибирская обл.) и Т. А. Авдоиной (ИМБ АН СССР) соответственно.

Подготовка образцов. Ооцитную (MFO) и соматическую (MFS) 5S рРНК из неоплодотворенной икры и печени вьюна выделяли как описано в работах [3, 17]. Мечение по 5'-концу [γ - ^{32}P]АТФ и последующую очистку проводили по методу Дони-Келлера [18]. Меченную ^{32}P 5S рРНК перед гидролизом РНКазами Т1, S1 и CVE подвергали частичной денатурации (65° С, 10 мин) и затем отжигу в течение 2 ч до 20° С в буферах для соответствующих нуклеаз.

Гидролиз осуществляли в условиях стабилизированной пространственной структуры при разных концентрациях ферментов* и разных временах инкубации в объеме 5 мкл. Условия гидролиза РНКазой S1: 40 мМ Na-ацетат, 200 мМ NaCl, 10 мМ ZnSO₄, pH 4,5; 1–10 мин при 37° С, концентрация фермента 10⁻² — 10⁻⁴ ед. акт. на 1 мкг РНК; РНКазой CVE: 15 мМ трис-HCl, pH 7,5; 10 мМ MgCl₂, 1,5–15 мин при 0° С, концентрация фермента 10⁻¹ — 10⁻³ ед. акт. на 1 мкг РНК. Реакции с РНКазами S1 и CVE останавливали добавлением 1–2 мкл 0,1 М EDTA [19]. Условия гидролиза РНКазой Т1: 10 мМ Na-цитрат, pH 5,5; 10 мМ MgCl₂; 200 мМ NaCl, 1,5–15 мин при 20° С, концентрация фермента 10⁻⁴ — 10⁻⁵ ед. акт. на 1 мкг РНК. После окончания инкубации к пробам добавляли по 5 мкл 100% формамида с 0,02% ксиленцианолом. Разделение продуктов ограниченного гидролиза проводили электрофорезом в 10 и 20% полиакриламидных гелях. Для точной идентификации мест расщепления нуклеазами использовали два маркера: Т1* — продукты гидролиза 5S рРНК нуклеазой Т1 в денатурирующих условиях (7 М мочевины, 50° С) — идентификация по положению гуаниловых остатков; «Ladder» — продукты ограниченного неспецифического гидролиза 5S рРНК (100° С, 12–15 мин [3]). Для проверки сохранности препаратов РНК каждый раз параллельно с гидролизом ставили контрольную пробу — инкубацию РНК в буфере без фермента. Авторадиографию полученных гелей проводили на рентгеновской пленке РТ-1 при -70° С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erdmann V. A., Muysmans E., Vandenberghe A., De Wachter A. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 1, p. r105–r133.
2. Wegnez M., Monier R., Denis M. FEBS Lett., 1972, v. 25, № 1, p. 13–20.
3. Mashkova T. D., Serenkova T. I., Mazo A. M., Avdonina T. A., Timofeeva M. Ya., Kisselev L. L. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 9, p. 2141–2151.
4. Fabian M., Bohm S., Welfle H., Reich P., Bielka H. FEBS Lett., 1981, v. 123, № 1, p. 19–21.
5. Vournakis J. N., Celentano J., Finn M., Lockard R. E., Mitra T., Pavlakis G., Troutt A., Van den Berg A. T. M., Wurst R. M. In: Gene amplification and analysis/Eds Chirikjian I. G., Papas T. S. N. Y., Amsterdam, Oxford: Elsevier/North-Holland, 1981, v. 2, p. 267–298.
6. Studnicka G. M., Eiserling F. A., Lake Y. A. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 8, p. 1885–1905.
7. Chan Y. L., Ulbrich N., Ackerman E. J., Todokoro K., Slobin L. I., Safer B., Sigler P. B., Wool L. G. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 5, p. 2522–2527.
8. Nazar R. N., Yaguchi M., Willick G. E. Can. J. Biochem., 1982, v. 60, № 4, p. 490–496.

* Активность ферментов определена в стандартных условиях [5].

9. Denis H., Wegnez M. *Develop. Biol.*, 1977, v. 59, № 2, p. 228–236.
10. Lazar E., Haendler B., Jacob M. *Nucl. Acids Res.*, 1983, v. 11, № 22, p. 7735–7741.
11. Toots I., Metspalu A., Villems R., Saarma M. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 20, p. 5331–5343.
12. Troutt A. A., Savin T. G., Curtiss W. C., Celentano J., Vournakis J. N. *Nucl. Acids Res.*, 1982, v. 10, № 2, p. 653–664.
13. Garrett R. A., Olesen S. O. *Biochemistry*, 1982, v. 21, № 19, p. 4823–4830.
14. Mankin A. S., Kagramanova V. K., Belova E. N., Teterina N. L., Baratova L. A., Bogdanov A. A. *Biochem. Intern.*, 1982, v. 5, № 6, p. 719–726.
15. Nishikawa K., Takemura S. *FEBS Lett.*, 1974, v. 40, № 1, p. 106–109.
16. Engelke D. R., Ng S.-Y., Shastry B. S., Roeder R. G. *Cell*, 1980, v. 19, № 3, p. 717–728.
17. Соловьева И. А., Тимофеева М. Я., Сосинская И. Е. *Онтогенез*, 1973, т. 4, № 4, с. 340–347.
18. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 10, p. 2527–2538.
19. Branlant C., Krol A., Machatt A., Ebel J.-P. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 2, p. 293–307.

Поступила в редакцию
22.V.1984

COMPARATIVE STUDY ON LOACH SOMATIC AND OOCYTE 5S rRNA USING STRUCTURE-SPECIFIC NUCLEASES

SERENKOVA T. I., MAZO A. M., MASHKOVA T. D., TIMOFEEVA M. Ya.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The secondary structure of two types of loach 5S rRNAs, somatic and oocyte, was studied by enzymatic methods. Labeled 5S rRNAs were subjected to partial hydrolysis with structure-specific nucleases S1, T1, and cobra venom nuclease. The pronounced differences between the secondary structure of somatic and oocyte 5S RNAs were revealed that were confined in the 5'-half of the molecules (the region from 5th to 65th nucleotides).