



УДК 577.247.347

РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК S1 В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСА 30S
РИБОСОМНОЙ СУБЧАСТИЦЫ *E. COLI* С РНК ФАГА MS2
ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ВНУТРЕННИМ РАЙОНОМ
ГЕНА РЕПЛИКАЗЫ

Бони И. В., Исеева Д. М., Будовский Э. И.

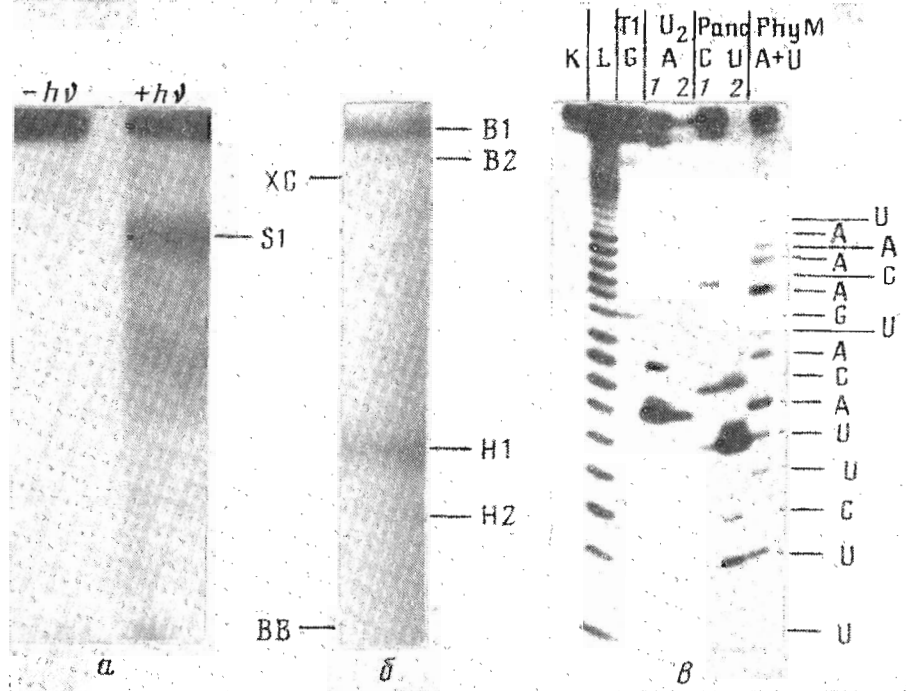
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

При изучении молекулярных механизмов биосинтеза белка у бактерий в качестве природных матриц используют РНК РНК-содержащих бактериофагов MS2, R17, Q_β и др. В структуре фаговых РНК закодирована информация не только для синтеза по меньшей мере четырех белков, но и для регуляции уровня экспрессии соответствующих генов, а также координирования процессов трансляции и репликации, матрицей для которых служит одна и та же (+)-цепь РНК (см. [1]). Как *in vivo*, так и *in vitro* белковый синтез начинается с гена белка оболочки бактериофага. Механизм узнавания рибосомой инициаторного кодона только этого гена в пространственной структуре целой молекулы РНК до сих пор до конца не ясен. В серии работ голландских исследователей [2–4] представлены убедительные доказательства того, что 30S субчастица рибосом способна узнать инициаторную область гена белка оболочки даже в отсутствие факторов инициации и инициаторной тРНК. Ключевым белком для такого узнавания является рибосомный белок S1 (см. [5]). Белок S1 входит также в качестве одной из четырех субъединиц в состав репликаз РНК-содержащих бактериофагов [6], поэтому выяснение его роли в трансляции и репликации необходимо для понимания молекулярных механизмов протекания и координирования этих процессов.

Современное представление о роли белка S1 в инициации трансляции сводится к тому, что он непосредственно взаимодействует с мРНК, обеспечивая ее закрепление на рибосоме (см. [5]). Участок РНК, взаимодействующий с белком, неизвестен, а следовательно, неизвестно, как при этом обеспечивается правильная посадка инициаторного кодона в декодирующем сайте рибосомы.

Целью настоящей работы явилось выделение участка РНК фага MS2, связанного с рибосомным белком S1 в комплексе РНК с 30S субчастицей рибосом *E. coli*, и определение его первичной структуры для локализации в цепи фаговой РНК, первичная структура и генетическая карта которой уже полностью известны [1, 7].

Инкубацию 30S субчастиц рибосом с РНК фага MS2 проводили при 37° С в присутствии фактора IF3. В этих условиях образуется функциональный комплекс, способный синтезировать белок оболочки при добавлении недостающих компонентов белоксинтезирующей системы [3]. РНК-белковые взаимодействия в комплексе фиксировали УФ-облучением, индуцирующим образование РНК-белковых сшивок в нуклеопротеидах [8, 9]. Из облученного комплекса методом центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы в диссоциирующих условиях выделяли мРНК. Присутствие белка S1, ковалентно связанного с РНК, было обнаружено методом иммуноферментного анализа с использованием специфических антител к белку S1 (антиS1-IgG). Отсутствие перекрестных реакций с другими рибосомными белками было доказано независимыми методами (будет опубликовано отдельно). РНК MS2 из облученного комплекса иммобилизовали на иммуносорбенте (сефарозе Cl-4B с кова-



Выделение и определение первичной структуры фрагмента РНК MS2, взаимодействующего с белком S1 в комплексе 30S-IF3-РНК MS2: а – автордиограмма 8% ПААГ, содержащего S1-олигонуклеотиды, выделенные из облученного (+hv) комплекса. (-hv) – контроль. Отмечено положение в геле свободного белка S1; б – разделение олигонуклеотидов в 20% ПААГ после гидролиза ковалентно связанного белка S1 протеиназой К. XC и BB – положение маркеров ксилецянола и бромфенолового голубого; в – определение нуклеотидной последовательности фрагмента B1 (см. б) ферментативным методом. Автордиограмма структурного 20% ПААГ. К – контроль (минус фермент). L – неспецифический гидролиз. T₁(G) – гидролиз по гуаниловым остаткам РНКазой T₁ (2·10⁻³ ед. акт.). U₂(A) – гидролиз по остаткам аденина РНКазой U₂ (1–0,5; 2–1 ед. акт.). Panc (C+U) – гидролиз РНКазой A по пиримидинам (1–2·10⁻⁴; 2–10⁻³ мкг). Phy M (A+U) – гидролиз по остаткам аденина и урацила РНКазой Phy M. Указаны количества ферментов на реакцию с 2 мкг тРНК-носителя

лентно связанным белком A *Staphylococcus aureus* в комплексе с антиS1–lgG), гидролизовали РНКазой T₁ в присутствии Mg²⁺ и сорбент отмывали от продуктов гидролиза. В результате на сорбенте удерживались лишь те олигонуклеотидные фрагменты, которые содержали ковалентно связанный белок S1 (S1-олигонуклеотиды). Их метили в иммобилизованном состоянии по 5'-концу с помощью [γ-³²P]АТР и T4-полинуклеотидкиназы. Затем проводили элюцию 1% раствором додецилсульфата натрия в 8 M мочеvine и электрофорез в 8% ПААГ (рисунок а). Положение полосы радиоактивности соответствовало положению белка S1 в данных условиях фореза. Элюцию S1-олигонуклеотидов из геля проводили одновременно с обработкой протеиназой К (КФ 3.4.21.14). Очистку свободных от белка фрагментов осуществляли электрофорезом в 20% ПААГ (рисунок б). Первичную структуру индивидуальных фрагментов определяли методом ферментативного секвенирования [10] (рисунок в).

Нуклеотидная последовательность основного верхнего фрагмента B1 (рисунок б) однозначно определена как UUUCUUACAUGACAUAUCC·UUGUCAUG и картирована внутри цистрона репликазы между нуклеотидами 2030–2056. Вторичную структуру фрагмента можно представить в виде шпильки с однонитевой областью AUCC на вершине (участки спаривания подчеркнуты), что согласуется с данными выщепления этого участка РНКазой T₁ в присутствии Mg²⁺ (данная статья), а также с существующими моделями структуры этой области РНК [11]. Мипорный

фрагмент В2 имеет ту же первичную структуру (данные не приведены) и, по-видимому, образуется из В1 в результате частичного расщепления УФ-индуцированной связи между аминокислотным остатком белка S1 и фрагментом РНК. Нижние фрагменты идентичны по 5'-концевой последовательности и принадлежат соседнему участку РНК (2016—2029, будет опубликовано отдельно). Фрагменты из других областей РНК не обнаружены.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при взаимодействии 30S субчастиц рибосом с РНК MS2 в условиях образования функционального предшественника трансляционного комплекса рибосомный белок S1 взаимодействует с внутренним районом репликазного гена, т. е. с областью РНК, удаленной от инициаторного участка гена белка оболочки на расстояние около 700 нуклеотидных остатков. Для того чтобы белок S1 обеспечивал при этом правильную инициацию, эти две области (инициаторная и «дальняя») должны быть сближены в третичной структуре РНК. Такая сближенность действительно наблюдается при исследовании организации молекулы РНК MS2 методом электронной микроскопии [11]. Наши результаты согласуются с гипотетической моделью А. Субрамания [12], по которой матрица взаимодействует с рибосомой в двух центрах — в декодирующем сайте и по РНК-связывающему домену белка S1, причем расстояние между этими центрами составляет ~70 Å [13].

Известно, что образование комплекса Q_{β} -репликазы с Q_{β} -РНК также зависит от белка S1, причем репликаза в этом случае выполняет функцию трансляционного репрессора и блокирует синтез белка оболочки [6]. Для этого комплекса было наглядно продемонстрировано связывание одной молекулы репликазы одновременно с двумя участками Q_{β} -РНК — перед началом гена белка оболочки и во внутреннем районе гена репликазы [14]. Таким образом, результаты настоящей работы по картированию участка РНК MS2, взаимодействующего с белком S1 в рибосомном комплексе, в совокупности с данными по связыванию Q_{β} -репликазы позволяют предположить важную функциональную роль внутреннего района репликазного гена в регуляции трансляции и репликации и его связь с инициаторной областью гена белка оболочки через систему дальних взаимодействий в пространственной структуре фаговых РНК.

Экспериментальная часть

Комплекс 30S субчастиц рибосом и РНК MS2 получали в присутствии фактора IF3 при 37° С согласно работе [3], облучали при 0° С УФ-светом (λ 254 нм, доза облучения 25 квантов на нуклеотид) и РНК MS2 выделяли в 10—30% сахарозном градиенте в диссоциирующих условиях (20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 0,15 М LiCl, 10 мМ EDTA, 0,1% додецилсульфат натрия). По 3 ОЕ₂₆₀ РНК MS2, выделенной из облученного ($+h\nu$) и контрольного ($-h\nu$) комплексов, инкубировали с 40 мкл геля А-белок-сфара роза CL-4B (Pharmacia), содержащего 250 мкг связанных IgG из антисыворотки кролика к белку S1. Инкубацию и последующий гидролиз РНКазой T₁ (5 ед. акт./1 ОЕ₂₆₀ РНК) проводили в 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 100 мМ NH₄Cl, 10 мМ MgCl₂. После удаления продуктов гидролиза иммуносорбент переводили в буфер для реакции кипирования и иммобилизованные S1-олигонуклеотиды метили в присутствии 100 мкКи [γ -³²P]АТФ и 10 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы (30 мин, 37° С). Меченые S1-олигонуклеотиды элюировали 1% раствором додецилсульфата натрия в 8 М мочеvine и наносили на 8% ПААГ, содержащий 0,1% додецилсульфат натрия и 8 М мочеvину (рисунок а). S1-олигонуклеотиды элюировали из геля в присутствии протеиназы К (5 мг/мл в 0,1% додецилсульфате натрия, 0,3 М NaCl), белок удаляли фенольной экстракцией; фрагменты, пересаживаемые из спирта, разделяли в 20% ПААГ (рисунок б). Первичную структуру олигонуклеотидов определяли ферментативным методом [10], используя РНКазы T₁ (P. L. Biochemicals), U₂ (Sankyo), A (P. L. Biochemicals) и Phy M (P. L. Biochemicals, sequen-

се grade). Количества ферментов на одну реакцию указаны в подписи к рисунку в. Неспецифический гидролиз проводили в 1 М триэтиламинe при 55° С в течение 30 и 60 мин, после чего пробы объединяли, упаривали, добавляли маркеры-красители и наносили на гель. Гидролиз РНКазами проводили 30 мин при 55° С.

Авторы искренне благодарят С. В. Кириллова и В. И. Махио за предоставление препаратов 30S рибосомных субчастиц и инициаторного фактора IF3, А. В. Честухина за препарат Т4-полинуклеотидкиназы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kastelein R. A., Remaut E., Fiers W., van Duin J. *Nature*, 1982, v. 295, № 5844, p. 35–41.
2. Van Dieijen G., Zipori P., van Prooijen W., van Duin J. *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 90, № 3, p. 571–580.
3. Zipori P., Bosch L., Van Dieijen G., van der Hofstad G. A. J. M. *Eur. J. Biochem.*, 1978, v. 92, № 1, p. 225–233.
4. Van Duin J., Overbeek G. P., Backendorf C. *Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 110, № 2, p. 593–597.
5. Subramanian A. R. *Prog. Nucl. Res. Mol. Biol.*, 1983, v. 28, p. 101–142.
6. Blumenthal T., Carmichael G. G. *Ann. Rev. Biochem.*, 1979, v. 48, p. 525–548.
7. Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegeman G., Iserentant D., Merregaert J., Min You W., Molemans F., Raeymaekers A., van der Berghe A., Volckaert G., Ysebaert M. *Nature*, 1976, v. 260, № 5551, p. 500–507.
8. Schimmel P. R., Budzik G. P. *Meth. Enzymol.*, 1977, v. 46, p. 168–180.
9. Budowsky E. I. In: *Trends in Photobiology*/Eds Helene C., Charlier M., Montenay-Garistier Jh., Yaustricet G./N. Y.—L.: Plenum Press, 1982, p. 93–108.
10. Donniss-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. *Nucl. Acid. Res.*, 1977, v. 4, № 8, p. 2527–2538.
11. Jacobson A. B., Kumar H., Zuker M. J. *Mol. Biol.*, 1985, v. 181, № 4, p. 517–531.
12. Subramanian A. R. *Trends Biochem. Sci.*, 1984, v. 9, № 11, p. 491–494.
13. Odom O. W., Deng H. Y., Subramanian A. R., Hardesty B. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1984, v. 230, p. 178–193.
14. Vollenweider H. J., Koller Th., Weber H., Weissman C. J. *Mol. Biol.*, 1976, v. 101, № 3, p. 367–377.

Поступило в редакцию
26.VII.1985

RIBOSOMAL PROTEIN S1 BINDS TO THE INTERNAL REGION OF THE REPLICASE GENE WITHIN THE COMPLEX OF *E. COLI* 30S RIBOSOMAL SUBUNIT WITH MS2 PHAGE RNA

BONI I. V., ISAIEVA D. M., BUDOWSKY E. I.

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

The MS2 RNA fragments bound to ribosomal protein S1 within the complex of MS2 RNA with 30S ribosomal subunit have been isolated using a specially developed procedure and sequenced by the base-specific enzymatic method. The S1-binding site on MS2 RNA was identified as UUUCUACAUGACAAAUCCUUGUCAUG and mapped within the replicase gene at positions 2030–2056. This finding suggests that ribosome-MS2 RNA interaction involves at least two different regions of the phage RNA — the internal region of the replicase gene (S1-binding site) and ribosome-binding site of the coat protein gene. The possible spatial proximity between these two regions is discussed.

Технический редактор Е. С. Кузьмишкина

Сдано в набор 20.11.85 Подписано к печати 13.01.86 Т-00207 Формат бумаги 70×108^{1/8}
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,7 тыс. Уч.-пед. л. 13,4 Бум. л. 4,5
Тираж 908 экз. Зак. 2079

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, Б-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6