



УДК 577.217.348

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ С НЕМОДИФИЦИРОВАННОЙ
И МОНОМЕРКУРИРОВАННОЙ $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ В КОМПЛЕКСЕ
С 30S СУБЧАСТИЦАМИ РИБОСОМ *E. COLI* И poly(U)

Абдурашидова Г. Г., Наргизян М. Г., Будовский Э. Н.

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

Показано, что при ультрафиолетовом ($\lambda 254$ нм) облучении комплексов немодифицированной и мономеркурированной $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ с poly(U) и 30S субчастицей рибосом *E. coli* образуется одинаковый набор белков, ковалентно сшитых с тРНК. Следовательно, наличие атома ртути в тРНК не влияет на ее расположение в комплексе. С другой стороны, белки, пришитые к тРНК в этом комплексе, не экранируют атом ртути в мономеркурированной тРНК от взаимодействия с тиопропил-сефаразой.

Для изучения РНК-белковых взаимодействий в рибосомных комплексах на различных этапах трансляции широко используется УФ-индуцированное образование ковалентных связей между компонентами РНК и белка, взаимодействующих друг с другом в составе исходного нуклеопротеида [1–3]. При облучении одновременно и с сопоставимыми квантовыми выходами образуются сшивки нескольких белков с каждым из полинуклеотидов в составе комплекса [3]. Поэтому решающую роль для получения интерпретируемых результатов играет выделение белков, сшитых с одной из молекул РНК в составе комплекса. Такая задача легко решается для высокомолекулярных рибосомных РНК [4, 5], но является чрезвычайно сложной для низкомолекулярных РНК. Рибосомные комплексы наряду с 5S РНК могут содержать две [6] и даже три [7, 8] молекулы тРНК, различающиеся по расположению в комплексе и, следовательно, взаимодействующие и сшивающиеся с различными белками [9, 10]. В этом случае обычные методы (электрофорез, хроматография и т. д.) либо вообще неприменимы, либо чрезвычайно трудоемки и не имеют общего значения.

Недавно в нашей лаборатории был разработан метод получения мономеркурированной тРНК [11]. Было показано, что один атом ртути в молекуле тРНК позволяет количественно выделять такую молекулу из сложных смесей, но не влияет на некоторые функциональные свойства тРНК [11]. Однако совпадение функциональных свойств немодифицированной и мономеркурированной тРНК не является доказательством одинакового расположения этих молекул в составе нуклеопротеидов. Поэтому в настоящей работе мы сопоставили взаимодействия (контакты) нормальной и мономеркурированной $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ с белками в комплексе с 30S субчастицей рибосом *E. coli* и poly(U) . Лишь в этом простейшем случае немодифицированная тРНК может быть изолирована из облученного комплекса путем последовательного удаления свободных белков, 16S РНК и poly(U) [4].

Для получения стандартных комплексов [12] использовали фракционированную poly(U) , содержащую 100 ± 20 мономерных звеньев (препарат любезно предоставлен В. И. Катуниним, ЛИЯФ). Комплексы, содержащие нормальную и мономеркурированную $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$, в пределах ошибки эксперимента не различаются по составу, функциональным свойствам и эффективности пришивки тРНК к 30S субчастице (табл. 1). Для определения белков, сшивающихся с нормальной тРНК, использовали описанный ранее метод последовательного удаления 16S РНК и poly(U) [4]. Мономеркурированную тРНК (свободную и сшитую с белками) из облу-

Состав и свойства комплексов 30S·poly(U)·AcPhe-тРНК^{Phe}, содержащих нормальную и мономеркурированную тРНК*
Приведены средние значения трех или более независимых экспериментов. Дисперсия не превышает 5%

Комплекс	Содержание AcPhe-тРНК ^{Phe} , моль/моль 30S субчастиц	Перенос на пу-ромидин AcPhe, %	Пришивка к 30S субчастице AcPhe-тРНК ^{Phe} , % **
30S·poly(U)·AcPhe-тРНК ^{Phe}	0,98	89	11
30S·poly(U)·AcPhe-тРНК ^{Phe} -Hg	0,97	91	9

* Инкубационная смесь для проведения пурамициновой реакции содержала в 1 мл буфера (10 мМ MgCl₂, 20 мМ трис-HCl (pH 6,5), 200 мМ NH₄Cl, 1 мМ EDTA) 50 пмоль 30S субчастиц, 50 мкг poly(U), 60 пмоль Ac[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}. Смесь инкубировали 60 мин при 4° С, добавляли 75 пмоль 50S субчастиц и после инкубации в течение 1 ч при 4° С определяли степень переноса AcPhe на пуридин по стандартной методике [17] (в процентах от содержания AcPhe-тРНК^{Phe} в комплексе).

** Рассчитывается по отношению к содержанию в комплексе при поглощенной дозе 15 квантов на нуклеотид.

Таблица 2

Белки 30S субчастицы рибосомы *E. coli*, пришивающиеся к нормальной и мономеркурированной AcPhe-тРНК^{Phe} при ультрафиолетовом (λ 254 нм) облучении в составе тройного комплекса 30S·poly(U)·AcPhe-тРНК^{Phe}

Комплекс	Пришивающиеся белки (% от общего содержания) *					
	S4	S5	S7	S9, 11	S17	S18
30S·poly(U)·AcPhe-тРНК ^{Phe}	34	27	4	31	2	2
30S·poly(U)·AcPhe-тРНК ^{Phe} -Hg	38	23	2	35	1	2

* Приведены относительные радиоактивности (средние значения по трем и более независимым экспериментам) в процентах от общей радиоактивности геля, составляющей (20—50)·10³ имп/мин, фон 200—300 имп/мин. Дисперсия не превышает 10% для белков S4, S5, S9, 11 и 50% для S7, S17, S18.

ченных комплексов выделяли в одну стадию — сорбцией на тиопропил-сефарозе (ср. [11]).

Как набор белков, пришивающихся к тРНК, так и относительная эффективность их пришивки практически одинаковы для комплексов, содержащих нормальную и мономеркурированную тРНК (табл. 2). Так как эти параметры чрезвычайно чувствительны к структуре комплексов и расположению в них макромолекул [4, 5, 13], то полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния атома ртути в тРНК на ее взаимодействие с белками в составе комплекса с 30S субчастицей и poly(U). С другой стороны, одинаковое распределение радиоактивности в белках, смитых с немодифицированной и мономеркурированной тРНК, говорит о том, что в данном случае пришитые белки не экранируют атом ртути в тРНК и способность меркурированной тРНК связываться с SH-сефарозой сохраняется и после пришивки белков.

Таким образом, мономеркурированная тРНК может быть использована при изучении непосредственных тРНК-белковых взаимодействий в составе сложных многокомпонентных нуклеопротендов.

Экспериментальная часть

Препараты 30S субчастиц рибосом *E. coli* были получены по [14, 15], [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} — по [16], [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe}-Hg — по [11], Ac[¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} и AcPhe-тРНК^{Phe}-Hg — ацетилированием [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} уксусным ангидридом [17].

Тройной комплекс $30S \cdot poly(U) \cdot Ac[^{14}C]Phe-tPHK^{Phe}$ получали и охарактеризовывали по методикам, описанным ранее [12].

Для образования УФ-индуцированных РНК-белковых сшивок свежеприготовленные растворы комплексов (2 мл, 5 ОЕ₂₆₀) облучали при перемешивании в чашках Петри при 4° С полным светом ртутной лампы низкого давления (λ 254 нм, доза ~15 квантов на нуклеотид). Интенсивность падающего света ($2 \cdot 10^{17}$ квант $\cdot$ см⁻² $\cdot$ мин⁻¹) определяли с помощью уридиновой актинометрии [18]. После облучения комплексы с немодифицированной $AcPhe-tPHK^{Phe}$ осаждали добавлением этанола, обрабатывали 1% раствором SDS, содержащим 19 мМ EDTA, и седиментировали в сахарозном градиенте 5–20% (ротор SW-40, 35 000 об/мин, 17 ч, 4° С). Фракцию, содержащую свободные белки, тРНК, poly(U) и сшитые с ними белки, осаждали этанолом и наносили на колонку (1×2 см) с poly(A)-целлюлозой (5 мг poly(A) на 1 г целлюлозы) для отделения тРНК от poly(U). Элюат наносили на колонку (0,5×2 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 10 мМ трис-HCl (pH 7,2), и промывали фенолом, насыщенным тем же буфером, для удаления свободных белков. тРНК элюировали 1 М NaCl и осаждали двумя объемами этанола. Белки, сшитые с тРНК, определяли после подпиривания и обработки сшитого тРНК-белкового комплекса РНКазой по описанной ранее методике [10]. Идентификацию и оценку количества сшитых белков проводили по радиоактивности соответствующих участков двумерной электрофограммы [19].

Комплексы, содержащие мономеркурированную тРНК [11], сразу после облучения наносили на колонку (0,5×2 см) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 10 мМ трис-HCl (pH 7,2), и промывали фенолом, насыщенным тем же буфером, для удаления несшитых белков. После удаления фенола низкомолекулярные РНК элюировали с DEAE-целлюлозы 1 М NaCl. Элюат наносили на колонку с SH-сефарозой (Pharmacia), отмывали все компоненты, не содержащие ртути, и затем мономеркурированную тРНК с пришитыми к ней белками элюировали буфером, содержащим 6 мМ β-меркаптоэтанол. После удаления β-меркаптоэтанол проводили подпиривание, РНКазный гидролиз и идентификацию белков, как указано выше для немодифицированной тРНК^{Phe}.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schimmel P. R., Budzik G. P. Meth. Enzymol., 1977, v. 46, p. 168–180.
2. Zwieb Ch., Brimacombe R. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 5, p. 1775–1790.
3. Budowsky E. I. In: Trends in Photobiology/Eds Helene C., Charlier M., Montenay-Garestier Th., Laustriat G. N. Y.—L.: Plenum Press, 1980, p. 93–108.
4. Абдурашидова Г. Г., Наргизян М. Г., Руденко Н. В., Турчинский М. Ф., Будовский Э. И. Молекуляр. биология, 1985, т. 19, № 2, с. 553–557.
5. Абдурашидова Г. Г., Цветкова Е. А., Будовский Э. И. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 3, с. 417–419.
6. Watson J. D. Bull. Soc. chim. biol., 1964, v. 46, № 5, p. 1399–1425.
7. Rheinberger H.-I., Sternbach H., Nierhaus K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 9, p. 5310–5314.
8. Grajevskaya R. A., Ivanov Yu. P., Saminsky E. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 128, № 1, p. 47–52.
9. Abdurashidova G. G., Turchinsky M. F., Aslanov Kh. A., Budowsky E. I. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 12, p. 3891–3909.
10. Abdurashidova G. G., Turchinsky M. F., Budowsky E. I. FEBS Lett., 1981, v. 129, № 1, p. 59–61.
11. Abdurashidova G. G., Nargisyan M. G., Budowsky E. I. Eur. J. Biochem., 1983, v. 136, № 1, p. 147–150.
12. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P. Nucl. Acids Res., 1981, v. 8, № 1, p. 188–196.
13. Бродье Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. Биоорганич. химия, 1979, т. 5, № 9, с. 1352–1360.
14. Семенов Ю. И., Мазно В. И., Кириллов С. В. Молекуляр. биология, 1976, т. 10, № 4, с. 754–763.
15. Кириллов С. В., Мазно В. И., Пешин Н. И., Семенов Ю. И. Молекуляр. биология, 1978, т. 12, № 3, с. 602–611.
16. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P. Eur. J. Biochem., 1978, v. 89, № 1, p. 297–304.
17. Haenni A. L., Chapeville F. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 114, № 1, p. 135–140.

18. Железнова Н. В., Симукова Н. А., Яковлев Д. Ю. В кн.: Этиология и специфическая профилактика гриппа. Л.: Медицина, 1979, с. 132—134.
19. Mets L., Bogorad L. Anal. Biochem., 1974, v. 57, № 1, p. 200—210.

Поступила в редакцию
2.VIII.1985

INTERACTION OF PROTEINS WITH NON-MODIFIED AND MONOMERCURATED
AcPhe-tRNA^{Phe} IN COMPLEXES WITH 30S SUBUNIT OF *E. COLI* RIBOSOME
AND poly (U)

ABDURASHIDOVA G. G., NARGISYAN M. G., BUDOWSKY E. I.

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

It is shown that ultraviolet (254 nm) irradiation of complexes of non-modified and monomercurated AcPhe-tRNA^{Phe} with poly(U)-charged 30S subunit of *E. coli* ribosome results in the same set of proteins cross-linked to tRNA. Hence the mercury atom in tRNA does not disturb the tRNA-protein interactions and the cross-linked proteins do not shield the mercury atom in monomercurated tRNA from the binding to thiopropyl-Sepharose.