



УДК 577.1

ТОПОГРАФИЯ 18S рРНК В МАЛОЙ СУБЧАСТИЦЕ  
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ РИБОСОМ ДРОЖЖЕЙ:  
ГИДРОЛИЗ РНКазой T<sub>1</sub>

Манькин А. С., Гопылов А. М.

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского  
Московского государственного университета*

На «поверхности» малой субчастицы рибосом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* найден ряд участков 18S рРНК, способных гидролизоваться РНКазой T<sub>1</sub>. Их локализация хорошо согласуется с предложенной ранее моделью вторичной структуры 18S рРНК. Наиболее экспонированными районами рРНК в субчастице оказались 5'-конец (нуклеотиды 1–85), середина молекулы (нуклеотиды 900–1000) и 3'-концевой район молекулы рРНК (нуклеотиды 1630–1788). Подобная специфическая укладка рРНК в малой субчастице характерна для рибосом цитоплазмы как эукариот, так и прокариот.

Рибосомная РНК (рРНК) играет существенную роль в структурной организации и функционировании рибосомы [1]. Исследования рРНК в составе рибосом до недавнего времени были сфокусированы на прокариотических объектах. Отставание в изучении рРНК эукариот связано не только со сложностью выделения интактных эукариотических рибосом, но и с тем, что эти рибосомы имеют более сложную структурную организацию, чем прокариотические [2].

Можно ожидать, что сравнительный анализ разных типов рибосом позволит выявить не только их различия и таким образом характерные черты, но и, что более важно, структурные особенности, присущие рибосомам и рРНК как таковым, независимо от источника их выделения.

Гидролиз различными нуклеазами как метод изучения участков рРНК, расположенных на «поверхности» рибосомы и, следовательно, доступных для атаки ферментами, широко используется для изучения топографии рРНК в рибосомах прокариот [5–7].

Данная работа посвящена изучению экспонированных участков 18S рРНК в малой субчастице рибосом цитоплазмы дрожжей с помощью гидролиза РНКазой T<sub>1</sub>, расщепляющей полинуклеотидную цепь по гуаниновым звеньям в однопяжесвых участках РНК. Ее предпосылками явилась разработка метода выделения из дрожжей цитоплазматических рибосом в интактной рРНК [3], а также установление полной первичной структуры гена 18S рРНК дрожжей [4].

При выделении цитоплазматических рибосом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* за основу был взят метод [3], позволяющий выделять рибосомы с интактной рРНК, в который были внесены следующие изменения. Для получения наибольшей доли активных рибосом в конце выращивания среду обогащали, добавляя аденин, урацил и глюкозу. После этого клетки

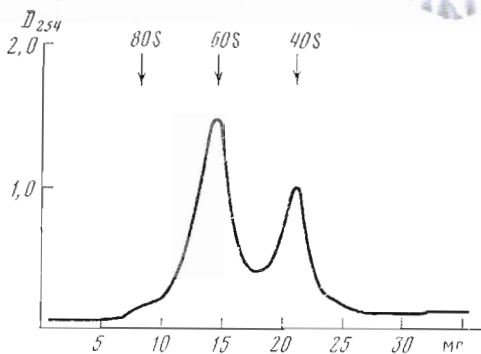


Рис. 1. Профиль разделения субчастиц рибосом цитоплазмы дрожжей ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы 5–25%. Стрелками обозначены положения 80S рибосом, 60S и 40S субчастиц

инкубировали с азидом натрия для получения депрограммированных моносом (Sisson С. Н., персональное сообщение), что заметно облегчало последующую стадию диссоциации рибосом на субчастицы. Для диссоциации рибосом использовались условия Назара [8] с небольшими изменениями. Добавление спермидина в присутствии ионов магния в высокой концентрации позволяло проводить диссоциацию рибосом на субчастицы при сохранении компактности последних. Это приводило, с одной стороны, к улучшению разделения субчастиц при ультрацентрифугировании в сахарозном градиенте (рис. 1), а с другой — способствовало сохранению интактности рРНК. Более того, оказалось, что после диссоциации рибосом в этих условиях субчастицы были способны к реассоциации в 80S рибосомы.

Гидролиз 40S субчастиц РНКазой  $T_1$  проводили при  $0^\circ\text{C}$  в присутствии большого избытка фермента. Это позволило уменьшить фон неспецифического расщепления 18S рРНК эндогенной нуклеазой [9]. Из рис. 2 видно, что спектр фрагментов, образующихся после инкубации субчастицы с РНКазой  $T_1$  в течение 5 мин, качественно не изменяется в последующие 55 мин; происходит только перераспределение выхода фрагментов в пользу более коротких. Для дальнейших опытов по гидролизу 40S субчастиц была выбрана 30-минутная инкубация, так как при этом выход различных фрагментов рРНК примерно одинаков. После инкубации с РНКазой, депротенинизации и дефосфорилирования 3'-концевое мечение фрагментов рРНК проводили по методике Уленбека и сотр. [10], основанной на лигировании фрагментов РНК с радиоактивным  $^{32}\text{P}$ Ср с помощью РНК-лигазы.

Смесь меченых фрагментов рРНК разделяли двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле по модифицированной методике Фирса и сотр. [11]. В первом направлении фрагменты рРНК разделяли электрофорезом в геле при рН 3,5. Подвижность фрагментов при этом в значительной степени зависела от их нуклеотидного состава. Во втором направлении проводился электрофорез при рН 8,3 для разделения фрагментов по длине. Это позволило эффективно разделить фрагменты рРНК длиной от 6–7 до 120–150 нуклеотидов (рис. 3). Положение зон фрагментов рРНК определяли автордиографией, фрагменты элюировали из геля и устанавливали их первичную структуру методом специфического химического расщепления по гетероциклическим основаниям [12] (например, см. рис. 4). Определение первичной структуры фрагментов рРНК позволило точно локализовать их, а следовательно, и атакуемую РНКазой  $T_1$  фосфодиэфирную связь в нуклеотидной последовательности 18S рРНК. Точная локализация 5'-концов некоторых длинных фрагментов в структуре 18S рРНК осложнялась чтением первичной структуры вблизи исходной зоны фрагмента на геле. В этих случаях 5'-концы локализовали, зная примерную длину фрагмента (определенную с точностью до 3–5 нуклеотидов) и специфичность действия РНКазы  $T_1$ .

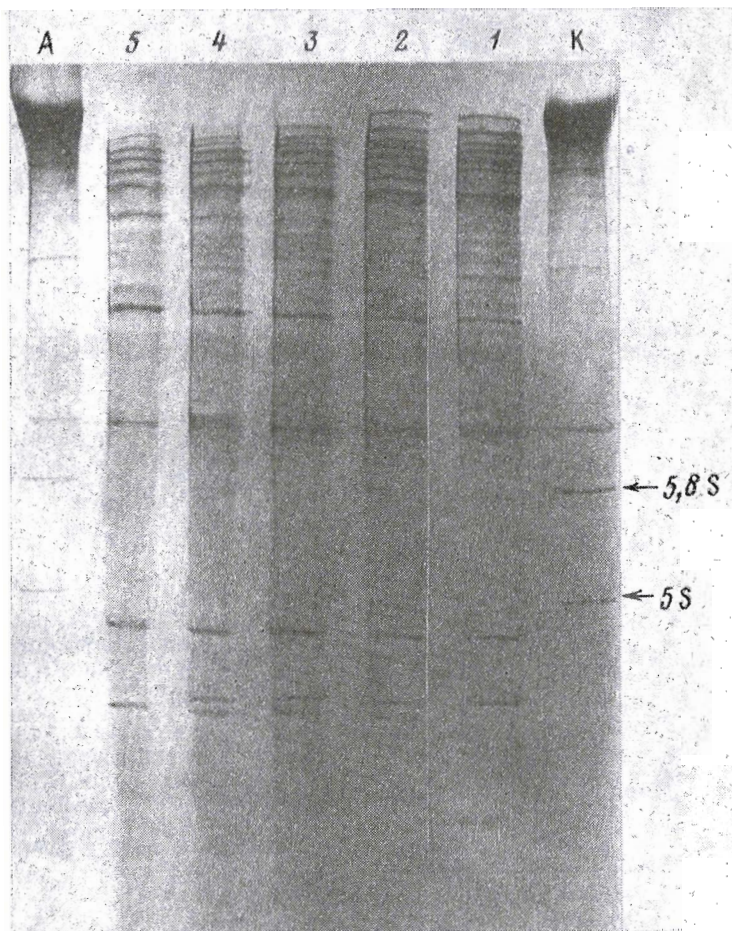


Рис. 2. Разделение в 8% полиакриламидном геле при pH 8,3 фрагментов 18S рРНК после гидролиза 40S субчастиц РНКазой  $T_1$  в течение 5 (1), 10 (2), 15 (3), 30 (4) и 60 мин (5). К – исходные 40S субчастицы, А – автолиз 40S субчастиц за 60 мин при 0° С

Как можно видеть из рис. 5, большинство атакуемых фосфодиэфирных связей находится в однотяжевых участках структуры 18S рРНК (10, 42, 69, 334, 903, 997, 1204, 1633, 1769 и другие нуклеотидные остатки). Некоторые немногочисленные атакуемые связи принадлежат двутяжевым участкам рРНК, однако они всегда соседствуют с G·U-парой и, таким образом, находятся в участках со слабой вторичной структурой (23, 597, 1223, 1646). Таким образом, полученные данные, являющиеся первой экспериментальной проверкой ранее предложенной модели структуры 18S рРНК эукариот [13], очень хорошо ей соответствуют.

При анализе распределения идентифицированных фрагментов по 18S рРНК (рис. 6) обращает на себя внимание тот факт, что при гидролизе 18S рРНК в составе 40S субчастицы рибосом три района рРНК особенно легко гидролизуются РНКазой: 5'-конец, середина и 3'-конец молекулы 18S рРНК.

В пределах 85 нуклеотидов с 5'-конца 18S рРНК картировано 6 мест гидролиза (рис. 5, 6), причем некоторые из них дублируются в ряде фрагментов. Видимо, этот район рРНК (район I) расположен на поверхности рибосомы и имеет довольно слабую вторичную структуру. Этот вывод хорошо согласуется с данными, полученными и для рибосом прокариот:

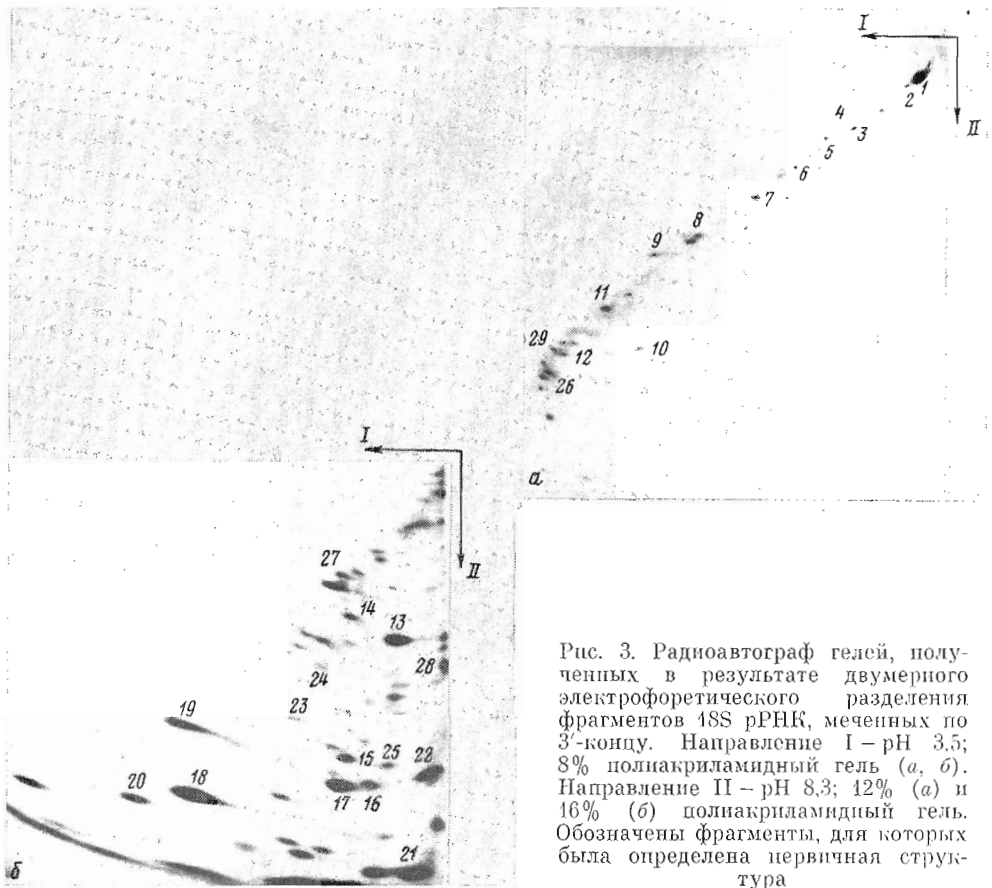


Рис. 3. Радиоавтограф гелей, полученных в результате двумерного электрофоретического разделения фрагментов 18S рРНК, меченных по 3'-концу. Направление I — рН 3,5; 8% полиакриламидный гель (а, б). Направление II — рН 8,3; 12% (а) и 16% (б) полиакриламидный гель. Обозначены фрагменты, для которых была определена первичная структура

аналогичный 5'-концевой район рРНК доступен в малой субчастице для нуклеазного гидролиза [6, 7] и для связывания олигонуклеотидов (Е. А. Скрипкин и др., персональное сообщение).

Средний район молекулы 18S рРНК (район II, нуклеотиды 900–1000) также очень доступен для гидролиза РНКазой T<sub>1</sub> и дает 5 фрагментов (рис. 5, 6). Аналогичный участок в центре молекулы 16S рРНК локализован на поверхности малой субчастицы рибосом прокариот [5, 6].

3'-Концевой район молекулы 18S рРНК (район III) — один из самых доступных для атаки РНКазой T<sub>1</sub> участков в субчастице (рис. 5, 6). Часть протяженной несовершенной шпильки 1647–1733 этого района при данных условиях гидролиза всегда выщепляется как единое целое, входя в состав ряда фрагментов рРНК. Локализация 3'-концевого района на «поверхности» малой субчастицы рибосом эукариот подтверждается и данными по химической модификации\*. Аналогичная топография этого района рРНК наблюдается и для прокариотических рибосом [5–7, 14, 15].

При определении нуклеотидной последовательности некоторых фрагментов 18S рРНК были обнаружены несоответствия в их первичной структуре и структуре, определенной ранее для гена 18S рРНК [4]. Вместо

\* Данные будут опубликованы особо.

последовательности GAAAC (нуклеотиды 1110—1113), определенной для гена 18S рРНК, нами найдена последовательность GAAC для самой 18S рРНК; вместо остатков гуанина в положениях 943, 962, 1732 для гена 18S рРНК в структуре 18S рРНК находятся остатки аденина. При более подробном анализе данных по первичной структуре гена 18S рРНК [4], проведенном совместно с авторами работы [4], оказалось, что полученную в настоящей работе последовательность нуклеотидов фрагментов 18S рРНК следует считать правильной.

Таким образом, предложенная ранее теоретическая модель вторичной структуры 18S рРНК эукариот [13] находится в хорошем соответствии с полученными экспериментальными данными. Кроме того, обнаруженные топографические особенности рРНК справедливы как для прокариотических рибосом, так и для рибосом цитоплазмы эукариот. По-видимому, эти характерные особенности вообще присущи организации рРНК в рибосомах.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали аденин, азид натрия, спермидин-НСI, трис (Sigma, США), диэтилпиокарбонат (Serva, ФРГ), урацил (Chemapol, ЧССР), бычий сывороточный альбумин (Koch-Light, США), Т4-РНК-лигазу (КФ 6.5.1.3; СКТБ БАН, Новосибирск), бактериальную щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1; Sigma, США); Т4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) любезно предоставлена д-ром Ч. Кантором (США).

*Выращивание клеток дрожжей и выделение 40S субчастиц рибосом.* Клетки гаплоидного штамма *Saccharomyces cerevisiae* 197-4D выращивали как описано ранее [3]. При достижении концентрации  $(2-3) \cdot 10^7$  клеток/мл ( $D_{650}$  0,8—1,0) в среду вносили аденин и урацил до концентрации 10 мг/мл, глюкозу до концентрации 2% и продолжали выращивание еще 45 мин. После добавления азидата натрия до концентрации 65 мг/мл и инкубации в течение 15 мин рост клеток останавливали добавлением льда (1/3 объема).

Рибосомы выделяли согласно [3]. Раствор рибосом в буфере А (50 мМ трис-НСI, рН 7,5; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 60 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0,6 мМ спермидин, 5 мМ меркаптоэтанол, 10% глицерина) с концентрацией 30—50 мг/мл разводили в 6 раз буфером для диссоциации (50 мМ трис-НСI, рН 7,6; 12 мМ MgAc<sub>2</sub>, 800 мМ KCl, 0,1 мМ спермидин, 5 мМ меркаптоэтанол) и 400 мкл наслаивали на сахарозный градиент 5—25% (36 мл) в том же буфере.

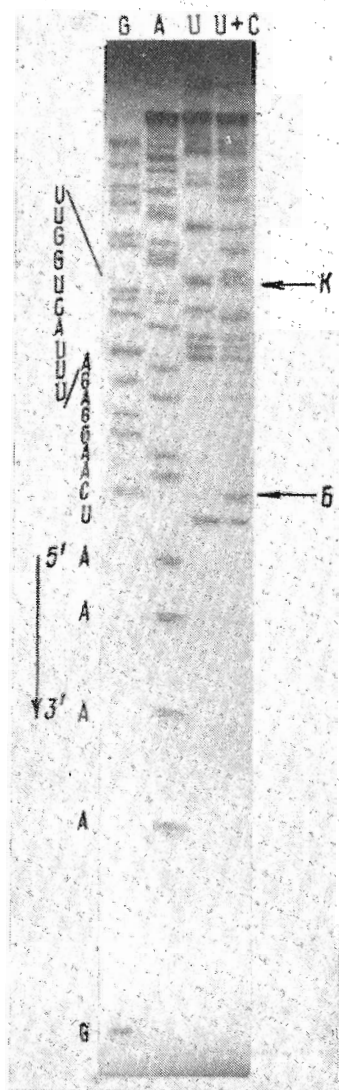


Рис. 4. Определение первичной структуры 3'-концевого района фрагмента 1 (рис. 3а) 18S рРНК методом Питти [12] на 20% полиакриламидном геле. Приведена читаемая последовательность, стрелкой 5'→3' обозначено направление полинуклеотидной цепи. К и Б показывают положение ксиленцианола и бромфенолового синего

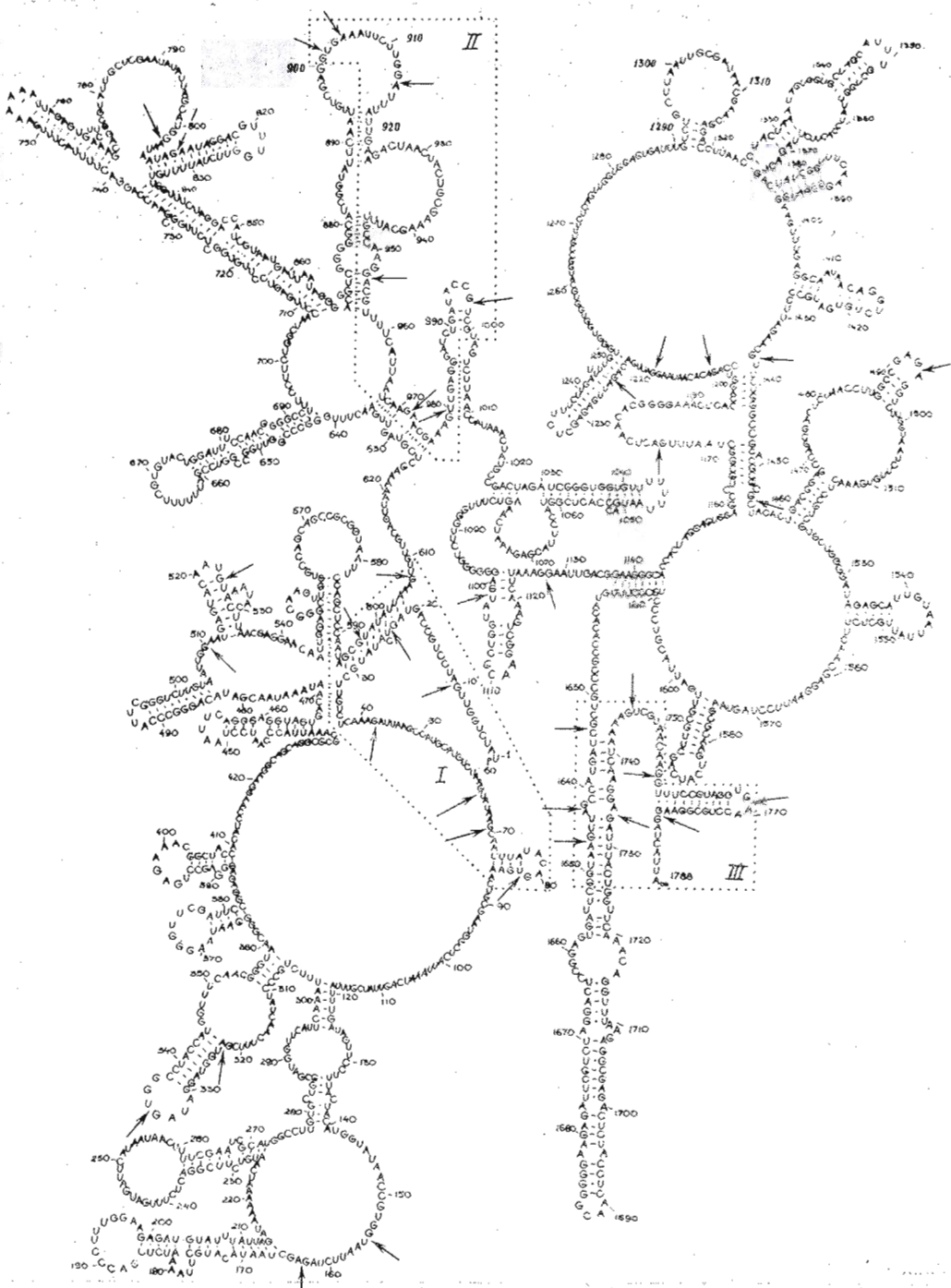


Рис. 5. Модель вторичной структуры 18S рРНК дрожжей [13] с соответствующей коррекцией первичной структуры, полученной в данной работе. Стрелками обозначены фосфодиэфирные связи, атакуемые РНКазой  $T_1$  в 40S субчастице рибосом. Районы I – III, ограниченные контуром, соответствуют наиболее экспонированным районам рРНК в субчастице

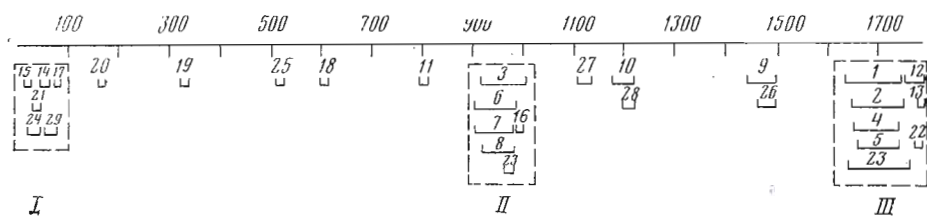


Рис. 6. Диаграмма распределения идентифицированных фрагментов (рис. 3) в первичной структуре 18S рРНК. Арабские цифры рядом с фрагментами соответствуют нумерации фрагментов на двумерном геле, а римские цифры – районам рРНК, находящимся на поверхности 40S субчастицы рибосом

Ультрацентрифугирование проводили в течение 6 ч при 3° С и 27 000 об/мин в роторе SW-27 на центрифуге «Spinco» (Beckman, США). Градиент фракционировали с помощью проточного УФ-спектрофотометра (ISCO) при длине волны 254 нм; фракции, соответствующие зоне 40S субчастиц, объединяли, субчастицы осаждали добавлением 1,5 объемов холодного этанола и выдерживанием в течение 12 ч при –20° С. Спиртовую суспензию субчастиц осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 5000 об/мин в роторе JA-20 (центрифуга J-21C, Beckman, США), высушивали в вакууме и растворяли в буфере А до концентрации 3–4 мг/мл. Аликвоты препарата 40S субчастиц хранили в жидком азоте.

*Гидролиз 40S субчастиц рибосом РНКазой T<sub>1</sub>.* Время гидролиза 40S субчастиц рибосом подбирали следующим образом. Раствор субчастиц в буфере А (3–4 мг/мл) инкубировали при 0° С с РНКазой T<sub>1</sub> (1100 ед. акт./мг субчастиц). Через определенные промежутки времени из гидролизата отбирали аликвоты (20 мкл), проводили фенольную депротенинизацию и после добавления маркеров-красителей фрагменты РНК разделяли электрофорезом в 8% полиакриламидном геле при рН 8,3. После электрофореза гель прокрашивали метиленовым синим [11] и фотографировали (рис. 2).

100 мкл раствора 40S субчастиц рибосом размораживали при 0° С и добавляли РНКазу T<sub>1</sub> (200 ед. акт./мкл) в соотношении 1110 ед. акт./мг субчастиц и инкубировали 30 мин при 0° С. После инкубации в гидролизат добавляли диэтилдиэтилокарбонат до концентрации 0,01%, додецилсульфат натрия до концентрации 0,5% и равный объем насыщенного водой фенола. После 3 мин интенсивного перемешивания эмульсию расслаивали на центрифуге (Type-320а, ПНР) 2 мин при 14 000 об/мин. Водный слой переносили в другую пробирку, повторяли фенольную экстракцию и экстрагировали тремя объемами диэтилового эфира, добавляли раствор ацетата натрия (рН 4,5) до концентрации 0,3 М и 3 объема холодного этанола. После инкубации в течение 5 мин при –70° С фрагменты РНК осаждали центрифугированием (5 мин при 14 000 об/мин) на центрифуге (Type-320а, ПНР). Осадок промывали 300 мкл этанола и высушивали в вакууме.

*Дефосфорилирование и 3'-концевое мечение фрагментов рРНК.* Сухой осадок фрагментов рРНК растворяли в буфере 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, добавляли раствор бактериальной щелочной фосфатазы (50 ед. акт./мкл) в соотношении 20 ед. акт./мг фрагментов рРНК и инкубировали 30 мин при 37° С. После инкубации фосфатазу удаляли двукратной фенольной депротенинизацией в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия и 10 мМ EDTA как описано выше. Фрагменты рРНК пересаждали из раствора 0,3 М ацетата натрия, осадок промывали этанолом и высушивали в вакууме.

Дефосфорилированные фрагменты рРНК растворяли в 10 мкл буфера, содержащего 100 мМ трис-НСl (рН 8,0), 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ меркаптоэтанол, 10% диметилсульфоксид и 50 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (Koch-Light, США), добавляли 3–6 ед. РНК-лигазы и 1 мКи <sup>32</sup>рСр,

полученного из Ср и [ $\gamma$ - $^{32}$ P] АТФ (Amersham, Англия) с помощью Т4-поли-  
нуклеотидкиназы (уд. акт.  $\sim 2000$  Ки/ммоль). Смесь инкубировали 5 ч при  
10° С, добавляли равный объем раствора красителей (0,05% ксиленцианол  
и 0,05% бромфеноловый синий в 8 М мочевины) и наносили на полиакрил-  
амидный гель.

*Двумерное разделение фрагментов рРНК в полиакриламидном геле.*  
Для двумерного разделения фрагментов рРНК был использован модифи-  
цированный метод Фирса и сотр. [11]. Разделение фрагментов в первом  
направлении проводили при рН 3,5 в 8% геле (здесь и далее соотноше-  
ние акриламид — бисакриламид 30 : 1); гель полимеризовали добавлением  
100 мг персульфата аммония и 300 мкл тетраметилэтилендиамина на  
100 мл раствора геля. Электрофорез проводили в течение 10 ч в пластине  
геля 1×200×800 мм при охлаждении в градиенте потенциала 25 В/см.  
После электрофореза полосу геля разрезали на 3 части длиной 260 мм  
каждая и вполимеризовывали в гель второго направления. Для разделения  
во втором направлении использовали два типа геля: фрагменты рРНК  
средней части кислого геля разделяли при рН 8,3 на 12% геле (1×350×  
400 мм), а фрагменты нижней трети кислого геля разделяли при рН 8,3  
на 16% геле. Электрофорез проводили 2—5 ч при градиенте потенциала  
30 В/см. Фрагменты рРНК локализовали в геле с помощью радиоавтогра-  
фии в течение 2 ч, рентгеновская пленка РМ-1 с применением усиливаю-  
щих экранов ЭУ-ВЗ. Элюцию фрагментов рРНК из геля и определение  
нуклеотидной последовательности рРНК проводили по методу Питти [12],  
используя гели толщиной 0,5 мм. Для определения первичной структуры  
использовали фрагменты рРНК, имеющие радиоактивность не менее 1,2 тыс.  
имп/мин (по Черенкову). Радиоавтографию проводили в течение 4—6  
недель при -70° С.

Авторы выражают благодарность А. А. Богданову, Х. Ф. Ноллеру,  
К. Г. Скрябину и П. М. Рубцову за поддержку и ценные замечания,  
Е. А. Скрипкину и В. К. Каграмановой за участие в обсуждении данной  
работы, Г. В. Федоровой за техническую помощь.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bogdanov A. A., Kopylov A. M., Shatsky I. N. The role of ribonucleic acids in the organization and functioning of ribosomes of *E. coli*.— In: Subcell. Biochemistry / D. B. Roodyn, ed. New York — London: Plenum Press, 1980, v. 7, p. 81—116.
2. Wool I. G., Stöffler G. Structure and function of eukaryotic ribosomes.— In: Ribosomes / M. Nomura, A. Tissieres, P. Lengyel, eds. Cold Spring Harbor, 1974, p. 417—460.
3. Марибона Р., Корнева С. Б., Копылов А. М. Выделение рибосом с интактной рРНК из дрожжей.— Биохимия, 1979, т. 44, вып. 9, с. 1701—1705.
4. Rubtsov P. M., Musachanov M. M., Zakharyev V. M., Krayev A. S., Skryabin K. G., Bayev A. A. The structure of the yeast ribosomal RNA genes. I. The complete nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*.— Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 23, p. 5779—5794.
5. Santer M., Shane S. Area of 16S ribonucleic acid at or near the interface between 30S and 50S ribosomes of *Escherichia coli*.— J. Bacteriol., 1977, v. 130, № 2, p. 900—910.
6. Woese C. R., Magrum L. J., Gupta R., Siegel R. B., Stahl D. A., Kop J., Crawford N., Brosius J., Gutell R., Hogan J. J., Noller H. F. Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence.— Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 10, p. 2275—2293.
7. Teterina N. L., Kopylov A. M., Bogdanov A. A. Segments of the 16S RNA located on the surface of the 30S subunits of *Escherichia coli* ribosomes.— FEBS Lett., 1980, v. 116, № 2, p. 265—268.
8. Nazar R. N. The release and reassociation of 5,8S rRNA with yeast ribosomes.— J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 3, p. 4505—4507.
9. Schulz-Harder B., Käuffer N., Swida U. A ribonuclease from yeast associated with the 40S ribosomal subunit.— Biochem. et biophys. acta, 1979, v. 565, № 1, p. 173—182.
10. England T. E., Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. Specific labeling of 3'-termini of RNA with T4 RNA-ligase.— In: Methods in Enzymology / K. Moldave et al., eds. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 65, part 1, p. 65—74.



11. Wachter R. de, Fiers W. Preparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA.— Anal. Biochem., 1972, v. 49, № 1, p. 184–197.
12. Peattie D. A. Direct chemical method for sequencing RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 4, p. 1760–1764.
13. Манькин А. С., Копылов А. М., Рубцов П. М., Скрябин К. Г. Модель вторичной структуры 18S рРНК эукариот.— Докл. АН СССР, 1981, т. 256, № 4, с. 1006–1010.
14. Rinke J., Ross A., Brimacombe R. Characterisation of RNA fragments obtained by mild nuclease digestion of 30S ribosomal subunits from *Escherichia coli*.— Eur. J. Biochem., 1977, v. 76, № 1, p. 189–196.

Поступила в редакцию  
23.III.1981

## TOPOGRAPHY OF 18S rRNA WITHIN THE SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT FROM YEAST CYTOPLASM: HYDROLYSIS WITH RNase T<sub>1</sub>

MANKIN A. S., KOPYLOV A. M.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Biorganic Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A number of 18S rRNA regions that are accessible to RNase T<sub>1</sub> hydrolysis have been found on the «surface» of the small ribosomal subunit from the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cytoplasm. Their location is in good agreement with the earlier proposed model for the 18S rRNA secondary structure. The most exposed regions of the 18S rRNA in the subunit are 85 nucleotides at the 5'-end, the middle part (nucleotides 900–1000) and the 3'-end regions. This kind of the rRNA specific folding within the small ribosomal subunit is a salient feature of ribosomes from the cytoplasm of eukaryotes as well as from prokaryotes.

---