



УДК 577.1 + 547.963.32

РНК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РИБСОМАХ.

V. ИЗУЧЕНИЕ ДОСТУПНОСТИ ОДНОТЯЖЕВЫХ И ДВУХСПИРАЛЬНЫХ
ОБЛАСТЕЙ РНК В РИБСОМНЫХ СУБЧАСТИЦАХ
С РАЗЛИЧНЫМ БЕЛКОВЫМ СОСТАВОМ

*Копылов А. М., Тетерина Н. Л., Потапов А. П.,
Василенко С. К., Богданов А. А.*

*Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии*

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

Доступность 16S-РНК в РНП* с различным белковым составом, полученных отщеплением определенных групп белков от 30S-субчастиц рибосом *E. coli*, оценивалась тремя методами: рибонуклеазным гидролизом, изучением связывания акридинового оранжевого с однотяжевыми и двухтяжевыми участками РНК и метилированием пурпурных оснований диметилсульфатом. Показано, что четыре белка (S4, S7, S8, S15), наиболее прочно ассоциированные с РНК, вызывают существенное уменьшение доступности как однотяжевых, так и двухтяжевых элементов макромолекулы РНК и формируют РНП с компактной структурой («структурный остов» 30S-субчастицы). Связывание остальных структурных белков малой субчастицы происходит по свободным (преимущественно однотяжевым) фрагментам РНК этой РНП-частицы, что приводит к еще большей экранированности 16S-РНК в 30S-субчастице.

В компактных нативных субчастицах рибосом определенная часть РНК находится на их поверхности и доступна для взаимодействия с растворителем [1], а также со специфическими участками информационных РНК [2, 3] и факторами белкового синтеза [4].

В настоящей работе исследована доступность однотяжевых и двухспиральных областей РНК в малой субчастице рибосом и рибосомных РНП с различным набором белков. Для этой цели использовано три независимых подхода: изучение кинетики гидролиза РНК рибонуклеазами А и T₁, изучение связывания с ней красителя акридинового оранжевого и определение степени модификации остатков аденина и гуанина в доступных диметилсульфату участках РНК.

Объектами исследования служили 16S-РНК, 30S-субчастицы рибосом *Escherichia coli* (штамм MRE 600), а также РНП_{0,5} и РНП_{3,0}, полученные обработкой 30S-субчастиц растворами LiCl с конечной концентрацией 0,5 и 3 М соответственно. Белковый состав этих РНП (табл. 1) показывает, что если в РНП_{0,5} отсутствовало лишь несколько кислых белков 30S-субчастицы, а большая часть так называемых дополнительных

* Сокращения: РНП — рибонуклеопротеидные частицы; m¹A — 1-метиладенин; m⁷G — 7-метилгуанин.

Белковый состав РНП-частиц

| Белок | 30S-суб-частицы | РНП _{0,5} | РНП _{3,0} | Белок | 30S-суб-частицы | РНП _{0,5} | РНП _{3,0} |
|-------|-----------------|--------------------|--------------------|-------|-----------------|--------------------|--------------------|
| S1 | + | | | S9 | + | + | |
| S2 | + | | | S11 | + | + | |
| S3 | + | | | S20 | + | + | |
| S12 | + | | | S17 | + | + | |
| S10 | + | (+) | | S19 | + | + | (+) |
| S13 | + | (+) | | S16 | + | + | (+) |
| S14 | + | (+) | | S4 | + | + | + |
| S18 | + | (+) | | S7 | + | + | + |
| S21 | + | (+) | | S8 | + | + | + |
| S5 | + | + | | S15 | + | + | + |
| S6 | + | + | | | | | |

Примечание. + — белки присутствуют примерно в тех же соотношениях, что и в 30S-субчастице. (+) — белки присутствуют в меньшем или следовом количестве.

структурных белков находилась в меньших количествах, то в РНП_{3,0} фактически содержалось лишь четыре белка, каждый из которых способен независимо от других белков 30S-субчастицы давать с 16S-РНК специфические и стабильные комплексы. По данным седиментационного анализа, РНП_{3,0} представляли собой гомогенные частицы с коэффициентом седиментации 24S.

Изменение степени и характера рибонуклеазного гидролиза определяли двумя способами: во-первых, модифицированным методом Гартмана и сотр. [5], когда начальные скорости гидролиза РНК измеряются по уменьшению количества интактной 16S-РНК, определяемого с помощью аналитического ультрацентрифугирования; во-вторых, по количеству моно- и олигонуклеотидов, выщепляемых РНКазами за данное время и определяемых как фракции, растворимые в спирте. Чтобы получить более полную информацию о поверхностных участках РНК, эти фракции разделяли далее по длине и определяли их суммарный нуклеотидный состав (рис. 1 и 2, табл. 2).

Как видно из сравнения кривых кинетики рибонуклеазного гидролиза, связывание с 16S-РНК уже небольшой группы белков (РНП_{3,0}) приводит к существенному экранированию ее однотяжевых участков от атаки ферментами. Весьма различную устойчивость к обеим РНКазам проявляют также 30S-субчастицы и РНП_{0,5}: при одном и том же фермент-субстратном соотношении РНКазы выщепляют из РНП_{0,5} вдвое больше олигонуклеотидов, чем из 30S-субчастиц.

Интересно, что в опытах по определению начальных скоростей появления разрывов в РНК мы не наблюдали расщепления РНКазой А 16S-РНК в составе 30S-субчастиц. Можно было предположить, что дополнительный структурный белок способствует сорбции РНКазы на рибосоме, тем самым инактивируя ее. Мы проверили это предположение, изучив гидролиз экзогенной 16S-РНК в присутствии 30S-субчастиц. Оказалось, что 30S-субчастицы не инактивируют фермент. Таким образом, сам дополнительный структурный белок рибосом способен эффективно защищать их РНК от ферментативного гидролиза.

Для изучения распределения по длине и составу выщепляемых олигонуклеотидов были выбраны условия, соответствующие точкам перегиба кинетических кривых (рис. 2). Олигонуклеотиды отделяли от рибосом хроматографией на сефадексе G-50 и затем фракционировали на DEAE-целлюлозе в условиях Томлинсона — Тенера [6]. Как показали

Таблица 2

Нуклеотидный состав и содержание изолянт в фракциях, выщелачиваемых РНКазой из рибонуклеопротеидных частиц

| Фермент | Препарат | Нуклеотидный состав, мол. % | | | | | Относительное содержание изолянт, % | | | | | |
|-----------------------|--------------------|-----------------------------|------|------|------|-------|-------------------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | | А | U | G | C | U+G+C | РНКазы | | | | | |
| | | | | | | | моно | ди | три | тетра | пента | гекса |
| РНКазы T ₁ | 30S-субчастицы | 30,7 | 24,6 | 27,8 | 24,0 | 1,06 | 36,2 | 15,0 | 14,5 | 24,5 | 10,0 | — |
| | РНП _{0,5} | 26,5 | 22,6 | 28,1 | 23,4 | 1,19 | 23,4 | 27,2 | 19,6 | 40,0 | 9,0 | 10,8 |
| | РНП _{3,0} | 23,7 | 23,4 | 27,5 | 25,2 | 1,07 | 48,5 | 37,6 | 16,6 | 10,7 | 10,7 | 12,8 |
| РНКазы А | 30S-субчастицы | 32,3 | 16,8 | 33,4 | 17,5 | 1,92 | 32,4 | 37,0 | 19,8 | 5,6 | 4,0 | 0,8 |
| | РНП _{0,5} | 32,2 | 17,5 | 34,6 | 15,8 | 2,01 | 31,0 | 34,0 | 19,5 | 8,7 | 5,9 | 2,9 |
| | РНП _{3,0} | 35,6 | 12,7 | 37,0 | 14,7 | 2,65 | 32,4 | 29,4 | 19,3 | 9,7 | 5,8 | 2,8 |

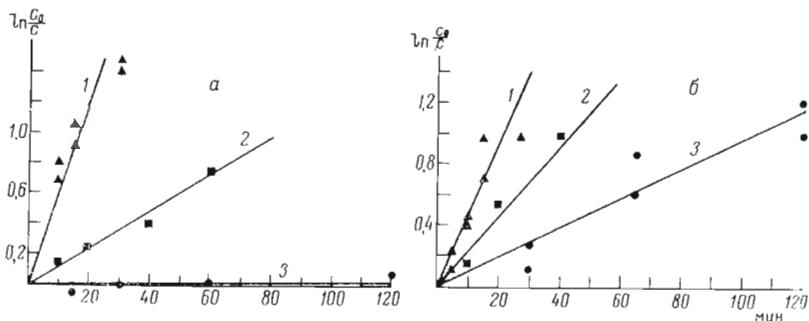


Рис. 1. Кинетика начального гидролиза 16S-РНК рибонуклеазами А (а) и T_1 (б). c_0 — исходная концентрация РНК; c — концентрация негидролизованной РНК к данному моменту времени. 1 — 16S-РНК, 2 — РНП_{3,0}, 3 — 30S-субчастицы

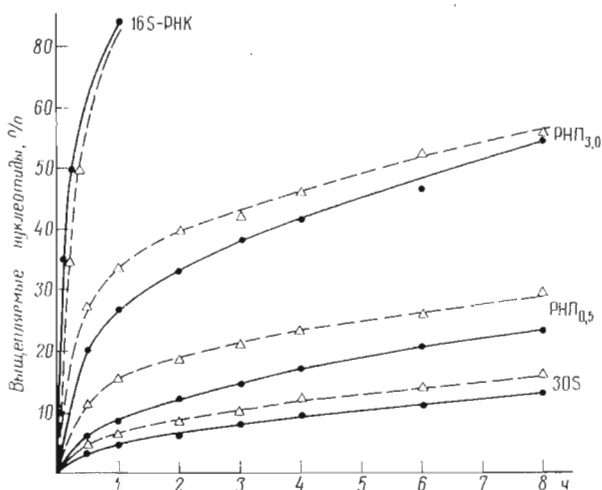


Рис. 2. Кинетика выщепления нуклеотидов из РНК- и РНП-частиц рибонуклеазами А и T_1 . Пунктир — РНКаза А; сплошная линия — РНКаза T_1

опыты, распределение олигонуклеотидов по длине примерно одинаково для всех РНП в случае РНКазы А и заметно отличается при гидролизе РНКазой T_1 (табл. 2). РНКаза А выщепляет из всех РНП олигонуклеотид с длиной цепи в 9 нуклеотидных остатков.

Для определения состава доступных РНКазам участков РНК олигонуклеотиды подвергали исчерпывающему щелочному гидролизу и мононуклеотиды разделяли хроматографией на анионите дауэкс 1×8 . Оказалось, что суммарный нуклеотидный состав фракций, выщепляемых ферментами, мало зависит от набора белков, связанных с РНК. Исключение составляют лишь 30S-субчастицы, из которых РНКаза T_1 выщепляет относительно больше аденинсодержащих и меньше гуанинсодержащих олигонуклеотидов, чем из других РНП. Различия же в нуклеотидном составе олигонуклеотидов, полученных с помощью РНКаз А и T_1 , вполне объясняются различной специфичностью этих ферментов. Нужно подчеркнуть также, что в 30S-субчастицах рибосом *E. coli* поверхностные участки РНК не обогащены каким-либо одним видом нуклеотидов, как, например, у рибосом эукариот [7].

Второй подход к изучению доступности РНК в РНП с различным белковым составом был связан с применением красителя акридинового оранжевого, который образует характерные комплексы с однотяжевыми и

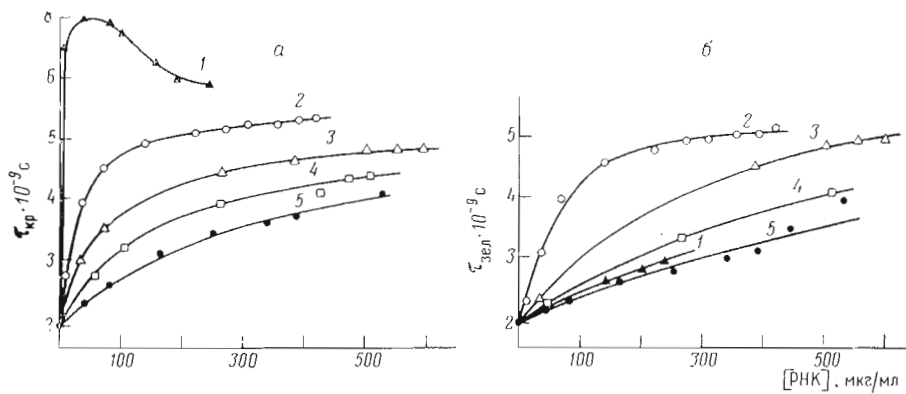


Рис. 3

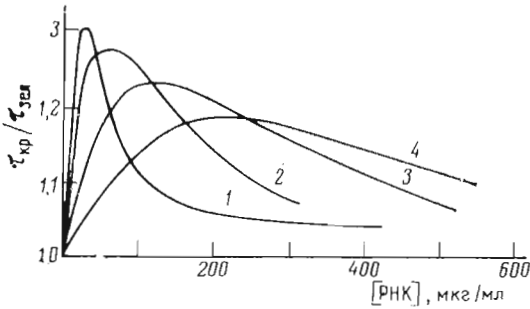


Рис. 4

Рис. 3. Изменение длительности красной (а) и зеленой (б) флуоресценции акридинового оранжевого в зависимости от концентрации полирибонуклеотида: 1 — poly(A), 2 — 16S-RНК, 3 — РНП_{3,0}, 4 — РНП_{0,5}, 5 — 30S-субчастицы. Концентрация АО в случае poly(A) $5,7 \cdot 10^{-6}$ M, в остальных случаях — $4,1 \cdot 10^{-6}$ M

Рис. 4. Зависимость отношения $\tau_{кр}/\tau_{зел}$ флуоресценции акридинового оранжевого от концентрации РНК: 1 — 16S-RНК, 2 — РНП_{3,0}, 3 — РНП_{0,5}, 4 — 30S-субчастицы

двухспиральными нуклеиновыми кислотами [8, 9]. Комплексы различаются по флуоресцентным свойствам, в частности по положению максимума спектра флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния. Максимум спектра флуоресценции как свободных, так и связанных с двухспиральной нуклеиновой кислотой мономеров акридинового оранжевого расположен в зеленой области спектра (~ 530 нм), длительность их флуоресценции (τ) равна соответственно $2 \cdot 10^{-9}$ и $5 \cdot 10^{-9}$ с. Комплекс акридинового оранжевого с однотяжевой нуклеиновой кислотой образуется при более высоких заполнениях последней красителем. Спектр флуоресценции такого комплекса сильно смещен в красную область, его максимум расположен около 640 нм. Время жизни возбужденного состояния красителя на однотяжевой нуклеиновой кислоте довольно велико ($\sim 20 \cdot 10^{-9}$ с). Поэтому данный параметр флуоресценции комплекса удобен для выявления однотяжевых участков РНК [10, 11]. Образующийся в сходных условиях комплекс акридинового оранжевого с двухспиральной нуклеиновой кислотой, спектр которого лежит в той же области, характеризуется существенно меньшим квантовым выходом и τ .

Результаты определения $\tau_{кр}$ и $\tau_{зел}$ комплексов акридинового оранжевого с 16S-RНК, 30S-субчастицами и РНП-частицами представлены на рис. 3 и 4. Концентрация красителя в каждом опыте была постоянной. Как и следовало ожидать, наибольшее значение $\tau_{кр}$ и наименьшее $\tau_{зел}$ наблюдается для комплексов акридинового оранжевого с poly(A), которая при нейтральных значениях pH представляет собой полностью однотяжевой полинуклеотид. Различия в ходе кривых $\tau_{кр}$ и $\tau_{зел}$ для 16S-RНК в свободном состоянии и в комплексе с белками свидетельствуют об уменьшении эффективной концентрации РНК, способной взаимодействовать с красителем по мере увеличения содержания белка в РНП. Количественная интерпретация этих результатов затруднительна, так как спектры флуоресценции различных форм красителя частично перекрываются.

Метилирование РНК- и РНП-частиц диметилсульфатом

| Препарат | Буфер | m^7G/m^1A , моль/моль |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 16S-РНК | Вода | $1,7 \pm 0,1$ |
| » | 0,01 М триэтаноламин-НСl, рН 7,5; 0,3 М КСl | $1,2 \pm 0,1$ |
| » | 0,01 М триэтаноламин-НСl, рН 7,5; 0,02 М MgCl ₂ | $0,8 \pm 0,1$ |
| » | 0,01 М триэтаноламин-НСl, рН 7,5; 0,02 М MgCl ₂ , 0,35 М КСl | $0,7 \pm 0,1$ |
| РНП _{3,0} | То же | $0,35 \pm 0,05$ |
| РНП _{0,5} | » | $2,1 \pm 0,5$ |
| 30S-субчастицы | » | $1,7 \pm 0,5$ |

В плане же качественной характеристики доступности однотяжевых и двухспиральных участков РНК можно воспользоваться анализом отношения $\tau_{\text{кп}}/\tau_{\text{зел}}$ как функции заполнения нуклеиновой кислоты красителем.

Все кривые на рис. 4 имеют максимум, амплитуда которого служит мерой соотношения способных к взаимодействию с красителем однотяжевых и двухспиральных областей 16S-РНК. Амплитуда этого максимума заметно уменьшается уже после связывания с РНК группы из четырех белков (S4, S7, S8 и S15) и продолжает падать по мере увеличения числа белков в РНП. Параллельно происходит смещение этого максимума вдоль оси концентрации РНК, что отражает уменьшение эффективной концентрации РНК, участвующей в связывании красителя. Из этих кривых следует также, что белки оказывают на состояние однотяжевых участков более глубокое воздействие, так как с увеличением содержания белка в РНП количество способных к связыванию акридинового оранжевого однотяжевых участков убывает быстрее, чем соответствующее число двухспиральных участков.

Третьим подходом к изучению доступных участков РНК было изучение метилирования пуриловых нуклеотидов в РНП диметилсульфатом. В последнее время этот агент широко используется для изучения структуры нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов [12—16]. Показано, что диметилсульфат метилирует как однотяжевые участки нуклеиновых кислот с образованием в качестве основных продуктов m^1A и m^7G , так и их двухспиральные области с образованием m^7G . Скорости метилирования гуанина в этих двух типах структур различаются незначительно [12].

В настоящей работе условия метилирования были таковы, что на одну молекулу 16S-РНК включалось в среднем не более 1,5 метильных групп. Как было показано Муром [16], при такой степени модификации РНК 30S-субчастицы полностью сохраняют свою функциональную активность. При модификации РНП-частиц, естественно, происходило и метилирование рибосомных белков, причем радиоактивная метка примерно в равной степени распределялась между белком и РНК.

Прежде всего мы убедились в том, что с помощью метилирования РНК диметилсульфатом можно следить за изменением конформации свободной РНК. Как видно из табл. 3, отношение m^7G/m^1A изменяется примерно вдвое при переходе от РНК, полностью лишенной двойных спиралей, к РНК с развитой вторичной структурой, имеющей компактную конформацию. Происходящее при этом уменьшение относительной доступности остатков гуаниловой кислоты (точнее, N⁷-атома в гуаниновом цикле) связано скорее всего с тем, что эти остатки вовлекаются в образование компактной третичной структуры РНК.

Интересно, что белки S4, S7, S8 и S15 как бы усиливают вовлеченность остатков гуаниловой кислоты во внутририбосомные взаимодействия, что

приводит к дополнительному уменьшению отношения m^7G/m^1A еще примерно в 2 раза. Связывание с РНК остальных белков 30S-субчастицы резко изменяет относительную доступность гуаниновых и адениновых звеньев, и отношение m^7G/m^1A сильно возрастает. Этот факт можно объяснить двояко: присоединение данной группы белков либо селективно вовлекает во внутририбосомные взаимодействия однотяжевые участки РНК, обогащенные адениловой кислотой, либо существенно изменяет относительную доступность однотяжевых и двухспиральных участков. В пользу последнего предположения говорят результаты, полученные при изучении связывания акридинового оранжевого с РНП. Кроме того, если бы для связывания белков действительно требовались А-богатые последовательности, это привело бы к значительному уменьшению доли адениловой кислоты в открытых участках 16S-РНК в РНП_{0,5} и в 30S-субчастицах по сравнению с РНП_{3,0}. Однако подобных изменений в нуклеотидном составе открытых участков РНК не происходит (см. табл. 2).

Результаты настоящей работы вместе с данными, полученными нами ранее [17, 18], позволяют, во-первых, проследить за изменениями, происходящими при внутририбосомных взаимодействиях в процессе формирования 30S-субчастицы, и, во-вторых, оценить роль различных групп белков в этом процессе. Справедливости ради нужно заметить, что ни один из методов, использованных в этой работе, ни их совокупность не позволяют однозначно ответить на вопрос, что является истинной причиной экранирования того или иного участка РНК — прямое взаимодействие белка с данным участком или же индуцированное белком включение этого участка во внутририбосомные взаимодействия (например, РНК-РНК-взаимодействия).

Представленные здесь данные еще раз свидетельствуют о том, что в ионных условиях, оптимальных для самосборки 30S-субчастиц, 16S-РНК находится в компактной форме. Связывание с этой формой РНК всего лишь четырех белков — S4, S7, S8 и S15 (белки S16 и S19 присутствуют в РНП_{3,0} в следовых количествах) — приводит к глобальным изменениям в ее структуре. Ранее нами было показано, что эти белки экранируют подавляющую часть однотяжевых участков РНК, способных давать сильные комплементарные комплексы с гексануклеотидами [18]. Таким образом, в РНП_{3,0} значительная доля длинных однотяжевых последовательностей недоступна с поверхности частицы. Этим, однако, нельзя объяснить все наблюдаемые здесь эффекты (например, изменение соотношения m^7G/m^1A). Создается впечатление, что белки S4, S7, S8 и S15 способны сильно компактизировать структуру РНП в целом (в пользу чего свидетельствует также достаточно высокий коэффициент седиментации РНП_{3,0}).

В связи с этим отметим, что белки S4, S7, S8 и S15 абсолютно необходимы для реконструкции 30S-субчастицы и от их присутствия зависит связывание с РНК по крайней мере еще 10—12 других белков [19]. С другой стороны, как было показано Зиммерманом, Фельнером и сотр. [20], эти белки связаны с участками 16S-РНК, сильно удаленными друг от друга в полинуклеотидной цепи: белок S4 связан с обширной областью в районе 5'-конца молекулы, участки связывания белков S8 и S15 с РНК расположены в центре молекулы, а белок S7 локализован в ее 3'-концевой области. Однако в 30S-субчастице эти белки находятся недалеко друг от друга: белки S4 и S7 могут быть сшиты ковалентной сшивкой с белком S8, который в свою очередь расположен по соседству с белком S15 [20]. Таким образом, наблюдаемая нами структурная реорганизация РНК под влиянием этих белков сопряжена со сближением дистальных участков цепи 16S-РНК. Способность белков РНП_{3,0} так сильно перестраивать структуру РНК несомненно связана с их крайне асимметричной структурой в составе 30S-субчастиц [21].

Присоединение каждой последующей группы белков к 16S-РНК усиливает изменения в ее структуре, вызванные первой группой: однотяже-

вые участки РНК становятся менее доступными, а структура РНП — более компактной. На поверхности 30S-субчастицы остается лишь сравнительно небольшая часть открытых однотяжевых участков (см. рис. 1, а также данные по комплементарному связыванию олигонуклеотидов в работах [18] и [22]), необходимых скорее всего для ее функционирования. При этом, по данным связывания акрифлавина с РНК и 30S-субчастицами [17], не менее 15—20% двутяжевых участков 16S-РНК в малой субчастице доступны для образования комплекса с красителем.

Экспериментальная часть

30S-субчастицы и 16S-РНК рибосом *E. coli*, штамм MRE 600, получали так, как описано в работе [23]. 30S-субчастицы дополнительно очищали центрифугированием в 0,5 М растворе NH_4Cl , содержащем 0,05 М трис-НСI-буфер (рН 7,8), 0,01 М MgCl_2 и 0,006 М β -меркаптоэтанол. РНП_{0,5} и РНП_{3,0} получали, инкубируя в течение ночи при 4° раствор 30S-субчастиц в 0,01 М трис-НСI-буфере (рН 7,6), содержащем 0,01 М MgCl_2 , с равным объемом 1 и 6 М водного раствора LiCl с последующим ультрацентрифугированием его в течение 7 ч при 186 000 g.

Кинетику гидролиза РНК в свободном виде и в составе РНП измеряли двумя способами. А) 2,5 мл раствора РНК (или РНП) в 0,03 М трис-НСI-буфере (рН 7,8), содержащем 0,02 М ацетат магния и 0,33 М NH_4Cl , с оптической плотностью D_{260} 1,2 инкубировали 15 мин при 38°, охлаждали до 20° и добавляли 0,25 мл водного раствора РНКазы А (Calbiochem, США) или РНКазы T_1 (Sanryo, Япония) с исходной концентрацией 0,05 и 0,1 мкг/мл соответственно. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 0,5 мл, добавляли к ним по 0,05 мл 2% водного раствора додецилсульфата натрия, прогревали 3 мин при 70° и быстро охлаждали. Полученные образцы анализировали на сканирующей аналитической ультрацентрифуге Spinco, модель Е (Beckmann, США) с ультрафиолетовой адсорбционной оптикой. Б) 4 мл раствора РНК (или РНП) в 0,01 М трис-НСI-буфере (рН 7,5), содержащем 0,01 М MgCl_2 и 0,1 М KCl, с D_{260} 10 инкубировали 30 мин при 25°, добавляли РНКазу А или T_1 из расчета 1,2 или 8 мкг фермента на 1 мг РНК соответственно. Гидролиз проводили при 25°. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 0,5 мл, к которым добавляли по 2 мл холодного этанола и 0,1 мл 2 М раствора ацетата натрия, рН 5. Пробы оставляли на 6—8 ч при -20°. Осадки отделяли центрифугированием, в надосадочной жидкости определяли D_{260} , из значения которого рассчитывали степень гидролиза.

Для анализа нуклеотидных фракций, выщепляемых из РНП ферментами, РНП гидролизovali РНКазами А или T_1 в течение 4 ч по методу Б.

Фракцию низкомолекулярных олигонуклеотидов отделяли от РНП гель-фильтрацией на сефадексе G-50 (колонокка 2 × 60 см), разводили в 4 раза водой и наносили для обессоливания на колонку (0,6 × 8 см) с целлюлозой DE-52 (Whatman, Англия). Колонку промывали 30 объемами 0,01 М бикарбоната аммония. Нуклеотиды элюировали 2 М раствором бикарбоната аммония, элюат упаривали в вакууме до полного удаления соли и фракционировали на микроколонке (объем 50—80 мкл) с DEAE-целлюлозой в условиях Томлинсона — Тенера [6]. Регистрацию оптического поглощения осуществляли с помощью микроспектрофотометра МСФП-1 (НИОХ СО АН СССР). Скорость элюции 150 мкл/ч, общий объем элюирующего раствора 0,6 мл.

Определение нуклеотидного состава выщепляемых фракций. 3—4 ОЕ обессоленной фракции низкомолекулярных олигонуклеотидов гидролизovali 18 ч 0,4 мл 0,5 н. NaOH при 37°. Гидролизат нейтрализовали амберлитом IRC (H^+ -форма), смолу промывали 5 объемами воды и растворы наносили на микроколонку (объем 50 мкл) с дауэксом 1 × 8 (HCOO^- -форма). Мононуклеотиды фракционировали стандартным методом в градиенте

концентрации формиата аммония 0—2 М, рН 4,2. Оптическую плотность регистрировали на микроспектрофотометре МСФП-1.

РНК и РНП метилировали [³H]-диметилсульфатом (Amersham, Англия) с уд. акт. 155 мКи/ммоль. Для этого 5 ОЕ препарата, предварительно проинкубированного в течение 10 мин при 37° в соответствующем буфере, приготовленном на основе триэтаноламина (см. табл. 3), обрабатывали 0,34; 0,47 и 0,78 мкмоль диметилсульфата в случае РНК, РНП и 30S-субчастиц соответственно. Смесь инкубировали 16 ч при 4°. РНК из РНП и 30S-субчастиц выделяли фенольной депротеинизацией. К пробам добавляли по 1—1,5 мг немеченой РНК и осаждали РНК этиловым спиртом. РНК отделяли центрифугированием, промывали спиртом и несколько раз переосаждали спиртом из раствора 0,2 М NaCl. Степень метилирования определяли по величине радиоактивности препаратов РНК, которую измеряли в диоксановом сцинтилляторе на счетчике Mark I (Nuclear Chicago, США). Анализ метилированных оснований проводили по методу Мирзабекова и сотр. [14] после гидролиза РНК 72% HClO₄ в течение 1 ч при 100°.

Длительность флуоресценции комплексов акридинового оранжевого с РНК и РНП определяли на фазовом флуорометре, изготовленном в мастерских лабораторного корпуса «А» МГУ. Концентрацию красителя определяли спектрофотометрически, принимая молярный коэффициент экстинкции ϵ_{494} равным 56 000 [24]. Флуоресценцию красителя возбуждали светом с длиной волны 436 нм (линия ртутной лампы ДРШ-250, выделенная комбинацией светофильтров СС4 и СЗС9). При измерении $\tau_{\text{всл}}$ пользовались комбинацией светофильтров СЗС9 и ЖС18, а также СЗС21 и ЖС18. Для измерения $\tau_{\text{кр}}$ использовали светофильтр КС13.

Белковый состав РНП-частиц определяли методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле в условиях, описанных в работе [25].

Авторы выражают благодарность Т. Быстровой и А. Ишутиной за выделение препаратов 30S-субчастиц, В. Годик и Ё. Глотову за содействие в проведении измерений на фазовом флуорометре и П. Колмыкову и В. Я. Черняку за помощь в проведении опытов по аналитическому ультрацентрифугированию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cotter R. I., Gratzer W. B. (1971) Eur. J. Biochem., 23, 468—474.
2. Shine J., Dalgarno L. (1975) Nature, 254, 34—38.
3. Steitz J. A., Jakes K. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4734—4738.
4. Van Duin J., Kurland C. G., Dondon J., Grunber-Monago M. (1975) FEBS Lett., 59, 287—290.
5. Hartman K. A., Amaya J., Schachter E. M. (1970) Science, 170, 171—173.
6. Tomlinson R. V., Tener G. M. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 2644—2645.
7. Lind A., Villems R., Saarna M. (1975) Eur. J. Biochem., 51, 529—536.
8. Azegawi M., Iwai K. (1964) J. Biochem., 55, 346—352.
9. Ishimura S., Zama M., Fujita H. (1971) Biochim. et biophys. acta, 240, 485—495.
10. Романовская Л. Н., Кульба А. М., Габрилович И. М. (1972) Биофизика, 17, 313—316.
11. Суровая А. Н., Борисова О. Ф., Минят Э. Е. (1972) Молекулярн. биология, 6, 408—415.
12. Singer B., Fraenkel-Conrat H. (1969) Biochemistry, 8, 3260—3266.
13. Singer B., Fraenkel-Conrat H. (1969) Biochemistry, 8, 3266—3269.
14. Mirzabekov A. D., Melnikova A. F. (1974) Mol. Biol. Rep., 1, 379—384.
15. Mirzabekov A. D., Kolchinsky A. M. (1974) Mol. Biol. Rep., 1, 385—390.
16. Moore G. (1975) Can. J. Biochem., 53, 328—337.
17. Потапов А. П., Шаласва Е. С., Борисова О. Ф., Богданов А. А. (1973) Докл. АН СССР, 208, 468—471.
18. Kopylov A. M., Chichkova N. V., Bogdanov A. A., Vasilenko S. K. (1975) Mol. Biol. Rep., 2, 95—100.
19. Held W. A., Ballow B., Mizushima S., Nomura M. (1974) J. Biol. Chem., 249, 3103—3111.

20. Zimmermann R. A., Mackie G. A., Muto A., Garrett R. A., Ungewickell E., Ehresmann C., Stiegler P., Ebel J. P., Fellner P. (1975) *Nucl. Acid Res.*, **2**, 279—302.
21. Tischendorf G. W., Zeiehardt H., Stöffler G. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4820—4824.
22. Vasilenko S. K. (1973) *Ribosomes and RNA Metabolism* (Zelinka J., Bakan J., eds.), pp. 151—160, Bratislava.
23. Копылов А. М., Шалаева Е. С., Богданов А. А. (1974) *Докл. АН СССР*, **216**, 1178—1181.
24. Stone A. L., Bradley D. F. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 3627—3634.
25. Welfle H., Stahl J., Bielka H. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **243**, 416.

Поступила в редакцию
14.V.1976

RNA-PROTEIN INTERACTION IN RIBOSOMES. V. ACCESSIBILITY OF SINGLE- AND DOUBLE-STRANDED REGIONS OF RNA IN RIBOSOMAL PARTICLES WITH DIFFERENT PROTEIN COMPOSITION

KOPYLOV A. M., TETERINA N. L., POTAPOV A. P.,
VASILENKO S. K., BOGDANOV A. A.

*A. N. Belosersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow, and Institute of Molecular
Biology and Genetics, Academy of Sciences of the Ukr. SSR, Kiev*

Three methods were used to study the accessibility of 16S RNA in ribonucleoprotein particles (RNP) of different protein composition which were obtained from 30S subunits of *E. coli* ribosomes by LiCl treatment: the RNase A and T₁ hydrolyses, the measurements of acridine orange binding to single-stranded and double-helical regions of RNA, and methylation of purine bases with dimethylsulfate. It was shown that four proteins — S4, S7, S8 and S15 — which were firmly associated with 16S RNA caused a dramatic decrease in the RNA accessibility and formed RNP with a very compact structure. The rest of small ribosomal subunit proteins bind to free (mainly single-stranded) regions of RNA in this RNP, thus giving rise to further screening of 16S RNA in 30S subunit.
