

А.С. Спирин

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Структура рибосомы и биосинтез белка

Допущено
Министерством высшего и среднего
специального образования СССР
в качестве учебника для студентов
биологических специальностей
высших учебных заведений



Москва

«Высшая школа» 1986

Глава I

МОРФОЛОГИЯ РИБОСОМЫ

1. РАЗМЕР, ВНЕШНИЙ ВИД
И ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ НА ДВЕ СУБЧАСТИЦЫ

Под электронным микроскопом рибосомы выглядят как компактные округлые частицы с линейными размерами около 25 нм (рис. 32), или несколько больше (до 30 нм) в случае эукариотических рибосом. Форма и детальные очертания рибосом из самых разнообразных организмов и клеток, включая как прокариотические, так и эукариотические, поразительно похожи.

Характерной чертой одной из видимых проекций является борозда, разделяющая рибосому на две неравные части (рис. 33). Это разделение отражает тот факт, что рибосома состоит из двух разделяемых субчастиц, или рибосомных субъединиц. Действительно, при

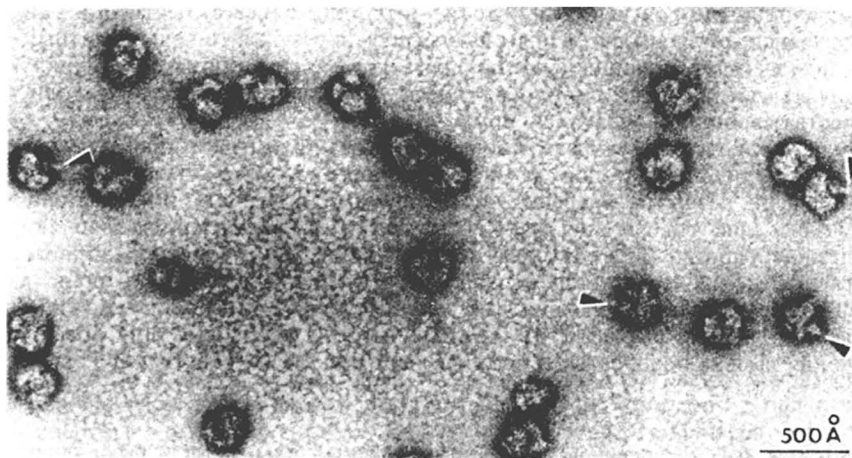


Рис. 32. Электронная микрофотография препарата 70S рибосом из *E. coli* (предоставлена В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушкино):

Чтобы обеспечить надлежащий контраст для наблюдения частиц под электронным микроскопом, выделенные 70S рибосомы наносятся на ультратонкую углеродную пленку; пленка с прилипшими частицами обрабатывается раствором уранилацетата и высушивается на воздухе. Уранилацетат обволакивает частицы и заполняет полости и щели. Являясь менее электроноплотным материалом, чем уранилацетат, рибосомные частицы оказываются *негативно контрастированными* на фоне уранилацетата. Стрелки указывают на палочкообразный стержень L7/L12, описанный в тексте

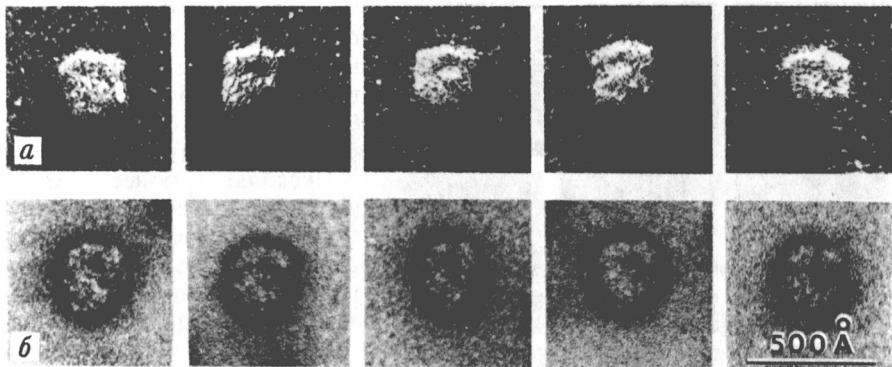


Рис. 33. Электронные микрофотографии индивидуальных 70S рибосом *E. coli*, демонстрирующие их подразделение на две неравные субчастицы (малая сверху и большая снизу) (предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушкино): *а* — рибосомы контрастированы с помощью техники оттенения металлом. В этом случае, чтобы обеспечить надлежащий контраст, суспензия выделенных 70S рибосом наносится на поверхность углеродной пленки и высушивается из замороженного состояния; затем на частицы наносится ультратонкий слой металла (вольфрама или вольфраморениевого сплава) путем его испарения в вакууме из такого положения, что частицы металла летят под определенным углом (в данном случае около 75°) к поверхности пленки; получаются *оттененные металлом* частицы; *б* — рибосомы контрастированы с помощью техники негативного контраста, как описано в подписи к рис. 32.

определенных условиях (например, при достаточном понижении концентрации Mg^{2+} в среде) рибосома диссоциирует на две субчастицы с соотношением масс около 2:1 (см. раздел V.1). Прокариотическая 70S рибосома диссоциирует на частицы с коэффициентами седиментации 50S (молекулярная масса $1,5 \cdot 10^6$ дальтон) и 30S (молекулярная масса $0,85 \cdot 10^6$ дальтон). Эукариотическая 80S рибосома может быть разделена на 60S и 40S субчастицы. Рибосомные субчастицы могут быть легко разделены в ультрацентрифуге и изучены отдельно.

2. ДЕТАЛЬНАЯ ФОРМА РИБОСОМНЫХ СУБЧАСТИЦ

Малая субчастица

Разные электронно-микроскопические проекции бактериальной (*E. coli*) рибосомной 30S субчастицы показаны на рис. 34, а фотография соответствующей морфологической модели — на рис. 35 (см. цветную вклейку). Видно, что 30S субчастица несколько продолговата; ее длина составляет около 23 нм, а ширина — около 12 нм. Она подразделяется на доли, называемые «головка», «тело» и «боковой выступ» (или «платформа»). Поперечная борозда, отделяющая головку от тела, видна наиболее четко.

Морфология эукариотической 40S субчастицы похожа, хотя можно указать на две дополнительные детали. Во-первых, это выступ головки («клюв») со стороны, противоположной боковой доле. Во-вто-

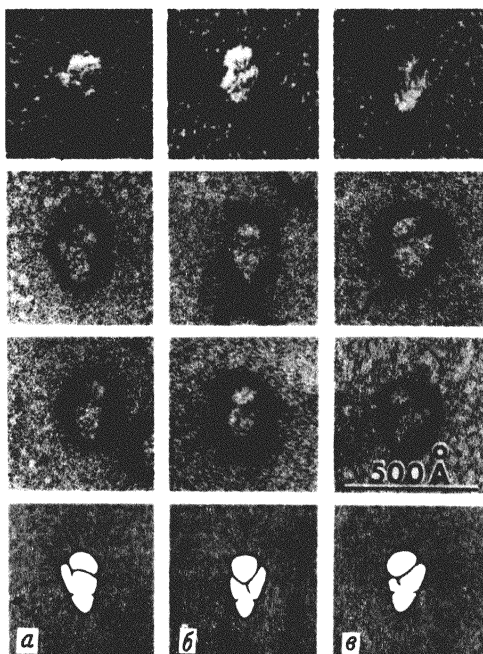


Рис. 34. Электронные микрофотографии индивидуальных 30S субчастиц рибосом *E. coli* (предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушкино):

верхний ряд — частицы, оттененные металлом (как описано в подписи к рис. 33, а); второй и третий ряды — частицы, контрастированные уранилацетатом (как описано в подписи к рис. 32); а — колонка изображений 30S субчастицы и ее контур в проекции, как она видима со стороны, противоположной той, что обращена к 50S субчастице в рибосоме; б — колонка изображений 30S субчастицы и ее контур в узкой боковой проекции; в — колонка изображений 30S субчастицы и ее контур в проекции когда она видима со стороны, обращенной к 50S субчастице в рибосоме

ние. В результате любого способа усреднения все случайные детали изображений убираются и выявляются элементы, общие для всех просуммированных изображений. Пример усреднения изображений негативно контрастированных 40S субчастиц из печени крысы дан на рис. 36, б. На всех трех проекциях видно, как четко, глубокой бороздой, отделена головка от остальной части частицы. На двух проекциях хорошо виден «клюв» головки. На этих же проекциях отчетливо проявляется боковая доля, частично накладывающаяся на тело частицы. Раздвоенный «хвост» («эукариотические лопасти») 40S частицы также выявляется очень ярко.

Интересно, что малая рибосомная 30S субчастица архебактерий

рых, конец тела, дистальный по отношению к головке, как бы раздвоен за счет присутствия там какой-то дополнительной массы («эукариотические лопасти») (рис. 36).

Несколько более надежную информацию можно получить из электронных микрофотографий, если анализировать не индивидуальные изображения частиц, а их так называемые усредненные изображения. Это помогает избавиться от статистического «шума» на фотографиях и выявить действительно общие черты изображений данной частицы. Для такого усреднения подбирают какое-то разумное количество (чем больше, тем лучше) изображений одной и той же проекции частицы и располагают их упорядоченным образом в строго одинаковой ориентации. Усреднение производится с помощью фильтрации на оптическом дифрактометре. Усреднение может быть проведено также цифровыми методами, что дает более широкие возможности; при этом достигается количественная оценка степени сходства выбранных изображений, точное их совмещение, снижение высокочастотных шумов и собственно усред-

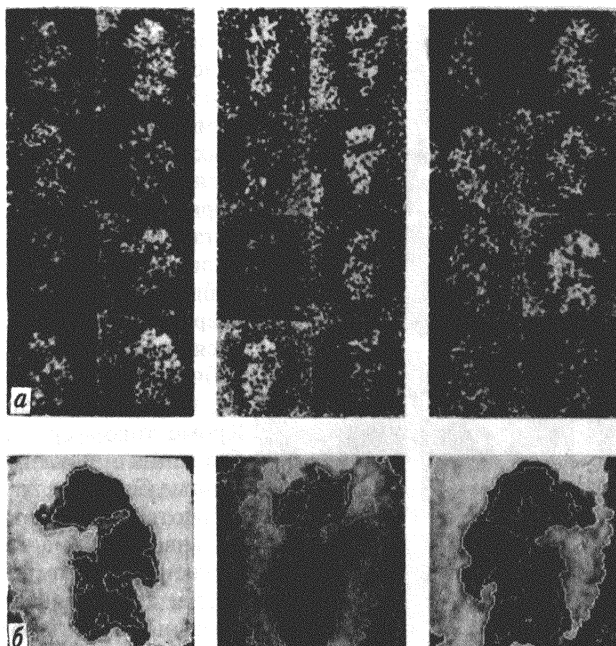


Рис. 36. Электронные микрофотографии индивидуальных 40S субчастиц рибосом печени крысы (предоставлены Н. А. Киселевым, Институт кристаллографии АН СССР, Москва):

a — частицы, контрастированные уранилацетатом (как описано в подписи к рис. 32); *б* — усредненные изображения частиц, контрастированных уранилацетатом (см. текст): три различных проекции

(метабактерий) имеет морфологию, промежуточную между таковыми 30S субчастиц эубактерий и 40S субчастиц эукариот: она имеет типичный «клюв» на головке, но не имеет «эукариотических лопастей» на конце тела.

Большая субчастица

Большие субчастицы как прокариотических (50S), так и эукариотических (60S) рибосом выглядят практически идентичными по своей форме. Разные проекции 50S субчастиц даны на рис. 37, а модель — на рис. 38 (см. цветную вклейку). Большая субчастица более изометрична, чем малая, имея во всех направлениях линейные размеры около 20–23 нм. В ней четко различаются три периферических выступа, или протуберанца: центральный, который может быть назван «головкой»; боковой палочкообразный отросток, так называемый «L7/L12-стержень»; боковой по другую сторону центрального протуберанца, обозначаемый как боковая доля, или «L1-ребро» (два боковых протуберанца 50S субчастицы *E. coli* содержат рибосомные белки L7/L12 и L1, соответственно, что специально будет рассмотрено в гл. Б.IV).

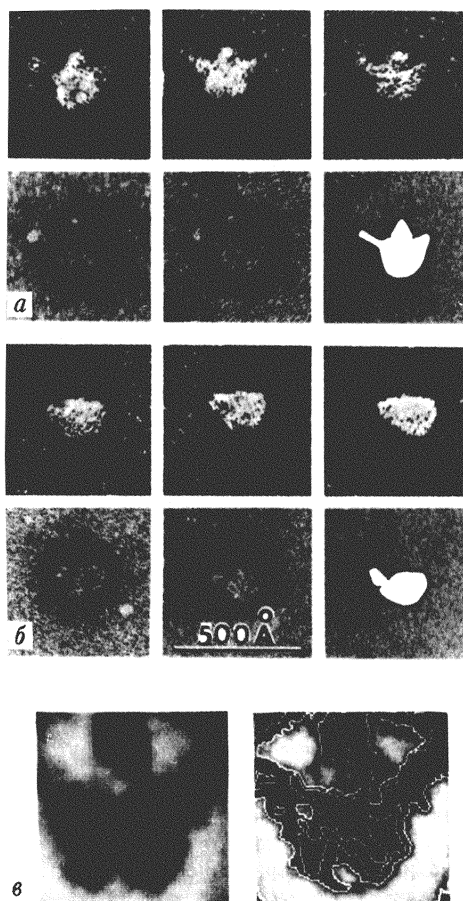


Рис. 37. Электронные микрофотографии индивидуальных 50S субчастиц рибосом *E. coli*; *a* и *б* предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пущино; *в* предоставлена Н. А. Киселевым, Институт кристаллографии АН СССР, Москва):

верхний и третий ряд — частицы, оттененные металлом (как описано в подписи к рис. 33а); второй и четвертый ряд — частицы, контрастированные уранилацетатом (как описано в подписи к рис. 32); нижний ряд — усредненные изображения частиц, контрастированных уранилацетатом (см. текст); *а* — изображения 50S субчастицы и ее контур в «задней» проекции, когда она видна с выпуклой стороны, обращенной от 30S субчастицы в рибосоме; *б* — изображения 50S субчастицы и ее контур в боковой проекции; *в* — усредненные изображения 50S субчастицы в фронтальной проекции, когда она рассматривается со стороны, обращенной к 30S субчастице в рибосоме

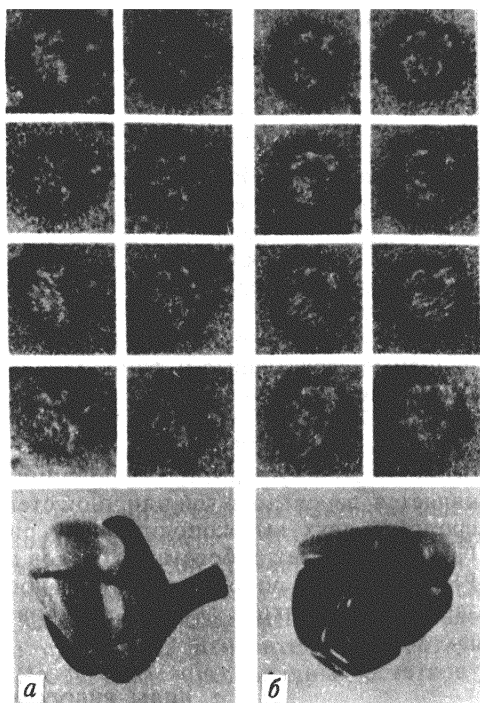
Усредненные изображения большой субчастицы *E. coli* (рис. 37, *в*) хорошо выявляют все те же детали, которые отмечаются на индивидуальных изображениях частиц. Опять-таки наиболее глубокая борозда отделяет головку от остальной частицы, причем борозда глубже со стороны L1-ребра, чем со стороны L7/L12-стержня. Здесь четко проявляется также раздвоение тела субчастицы, видимое на стороне, противоположной головке. Кроме того, усредненные изображения показывают, что многие более мелкие детали не являются случайными, а воспроизводятся на многих изображениях; это особенно касается так называемых «тяжелых структур» диаметром около 5 нм, которые видны на грани разрешения, как в малой (30S или 40S), так и в большой (50S или 60S) субчастицах и, как полагают, могут быть существенным структурным мотивом рибосомы.

3. ОБЪЕДИНЕНИЕ СУБЧАСТИЦ В ЦЕЛЮЮ РИБОСОМУ

Две рибосомные субчастицы объединены в полную рибосому строго определенным образом. Контактирующей стороной 50S субчастицы является ее уплощенная сторона; если смотреть на нее, то, когда «головка» субчастицы вверх, «стержень» будет справа (рис. 37 и 38). Субчастицы ассоциированы «головка к головке», а боковой выступ к боковому выступу. Ассоциация «головка к головке» хорошо видна на электронно-микро-

скопическом изображении одной из проекций 70S рибосомы (рис. 39,б). Электронно-микроскопическое изображение другой, так называемой «перекрывающейся», проекции (рис. 39,а) показывает, что 30S субчастица закрывает лишь часть уплощенной стороны 50S субчастицы, оставляя открытым район в основании бокового стержня. Этот район, по-видимому, является местом размещения функционально важных участков рибосомы (см. гл. В.1).

Фотография модели 70S рибосомы, составленной из 30S субчастицы и 50S субчастицы путем их ассоциации «головка к головке» и «боковой выступ к боковому выступу», дана на рис. 40 (см. цветную вклейку).



Рекомендуемая литература

Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М.: Наука, 1971.

Васильев В. Д. Морфологическая модель малой рибосомной 30S субчастицы. — Докл. АН СССР, 1974. Т. 219. С. 994—995.

Киселев Н. А., Орлова Е. В., Стельмашук В. Я. и др. Цифровое усреднение электронных микрофотографий 50S субъединиц рибосом. — Докл. АН СССР, 1982. Т. 267. С. 1488—1491.

Bielka H., ed. The Eukaryotic Ribosome. — Berlin: Akademie-Verlag, 1982.

Boublik M., Hellmann W. Comparison of *Artemia salina* and *Escherichia coli* ribosome structure by electron microscopy. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1978, v. 75, p. 2829—2833.

Hall C. E., Slayter H. S. Electron microscopy of ribonucleoprotein particles from *E. coli* — J. Mol. Biol., 1959, v. 1, p. 329—332.

Huxley H. E., Zubay G. Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *Escherichia coli*. — J. Mol. Biol., 1960, v. 2, p. 10—18.

Lake J. A. Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes. — J. Mol. Biol., 1976, v. 105, p. 131—159.

Lake J. A., Henderson E., Clark M. W., Matheson A. T. Mapping evolution with ribosome structure: Intralineage constancy and interlineage variation. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1982, v. 79, p. 5948—5952.

Nonomura Y., Blobel G., Sabatini D. Structure of liver ribosomes studied by negative staining. — J. Mol. Biol., 1971, v. 60, p. 303—324.

Vasiliev V. D. Electron microscopy study of 70S ribosomes of *Escherichia coli*. — FEBS Lett., 1971, v. 14, p. 203—205.

Рис. 39. Электронные микрофотографии индивидуальных 70S рибосом *E. coli* и их модель в двух различных проекциях (предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушино):

а — перекрывающейся проекции, когда 30S субчастица лежит поверх 50S субчастицы, б — боковой проекции, видимой со стороны бокового стержня L7 / L12; частицы контрастированы уранилацетатом, как описано в подписи к рис. 32.

Глава II

РИБОСОМНЫЕ РНК

1. ЗНАЧЕНИЕ РИБОСОМНОЙ РНК

Будет не очень большим преувеличением сказать, что рибосома есть прежде всего ее РНК. Примитивный предшественник рибосомы мог бы состоять только из РНК и лишь в ходе эволюции постепенно модифицироваться белками. Прокариотическая рибосома по массе на $2/3$ состоит из РНК, и лишь на $1/3$ из белков. Эволюционно более поздняя эукариотическая рибосома уже наполовину состоит из белков. Тем не менее, именно рибосомная РНК, по-видимому, определяет основные структурные и функциональные свойства рибосомы. Ковалентно-непрерывные цепи рибосомных РНК обеспечивают целостность рибосомных субчастиц. Специфическая пространственная структура рибосомных РНК обуславливает форму и ряд морфологических особенностей субчастиц. Ассоциация субчастиц в полную рибосому является, вероятно, в той или иной степени функцией специфического сродства двух высокополимерных рибосомных РНК друг к другу. Размещение всех рибосомных белков детерминировано рибосомными РНК. Наконец, рибосомные РНК вносят решающий вклад в организацию ряда функциональных центров рибосомы.

2. ВИДЫ РИБОСОМНЫХ РНК

Как прокариотическая, так и эукариотическая рибосомы содержат две различные высокополимерные РНК, по одной на каждую субчастицу, и одну относительно низкомолекулярную РНК, так называемую 5S РНК. Кроме того, эукариотические рибосомы содержат и другую относительно низкомолекулярную РНК, так называемую 5,8S РНК, которая является гомологом 5'-концевой части (около 160 нуклеотидных остатков) высокополимерной РНК большой субчастицы прокариот. В рибосомах хлоропластов высших растений имеется также так называемая 4,5S РНК, которая является гомологом 3'-концевой части (около 100 нуклеотидных остатков) высокополимерной РНК большой субчастицы бактерий. Таким образом, 5,8S РНК эукариотических рибосом и 4,5S РНК хлоропластных рибосом являются результатом расщепления («процессинга») предшественника высокополимерной РНК большой субчастицы в процессе биогенеза или созревания рибосом; они непосредственно участвуют в формировании структуры высокополимерной РНК большой субчастицы, как и их гомологичные последовательности у бактерий (см. ниже), и поэтому могут не рассматриваться как самостоятельные виды рибосомной РНК. В дальнейшем изложении они будут обсуждаться вместе с высокополимерной РНК большой субчастицы. Не исключено, что у некоторых видов организмов могут существовать и другие разрывы ковалентной цепи высокополимерной РНК в зрелой рибосоме.

Высокополимерная РНК малой субчастицы

Малая (30S) субчастица бактериальной рибосомы содержит РНК длиной около 1500—1600 нуклеотидных остатков (1542 в *E. coli*), обозначаемую как 16S РНК. Соответственно, молекулярная масса этой РНК составляет около $0,5 \cdot 10^6$ дальтон. 16S есть коэффициент седиментации ($s_{20,w}^0$) этой РНК в изолированном состоянии при концентрациях одновалентных солей около 0,1 М без Mg^{2+} . В этих условиях, однако, она довольно разрыхлена по сравнению с ее состоянием в рибосоме. Присутствие Mg^{2+} делает РНК существенно более компактной и приближающейся к состоянию (но все же не достигающей его полностью) *in situ*; коэффициент седиментации ($s_{20,w}^0$) становится равным около 22S при 20 мМ $MgCl_2$. Наоборот, при понижении ионной силы и при нагревании компактность 16S РНК понижается и коэффициент седиментации, соответственно, падает, вплоть до значений около 2—5S в отсутствие солей или при температурах выше 60°C (разворачивание).

30S субчастица рибосомы хлоропластов высших растений имеет 16S РНК приблизительно такого же размера (1490 нуклеотидных остатков у *Zea mays*). РНК малой рибосомной субчастицы митохондрий грибов и высших растений несколько крупнее (1661 нуклеотидный остаток у дрожжей). Наоборот, «минирибосомы» митохондрий млекопитающих содержат в малой субчастице относительно короткую РНК, обозначаемую как 12S РНК (954—956 нуклеотидных остатков у человека и мыши, соответственно).

У архебактерий, таких как *Halobacterium* и *Halococcus*, 16S рибосомная РНК из 30S субчастиц оказалась очень похожей по размеру на эубактериальную 16S РНК; ее длина оказалась равной 1472—1475 нуклеотидных остатков.

Эукариотические 40S субчастицы содержат существенно более крупную рибосомную РНК, обозначаемую как 18S РНК (иногда 17S РНК). Ее длина около 1800 нуклеотидных остатков (1789 в дрожжах, 1825 в *Xenopus laevis* и 1874 у млекопитающих); соответственно, молекулярная масса — около $0,6 \cdot 10^6$ дальтон. Поведение эукариотической 18S РНК в зависимости от ионной силы и присутствия Mg^{2+} во всем сходно с поведением прокариотической 16S РНК.

Высокополимерная РНК большой субчастицы

Большая (50S) субчастица бактериальной 70S рибосомы имеет РНК длиной около 3000 нуклеотидных остатков (2904 в *E. coli*), т. е. приблизительно в два раза крупнее 16S РНК; она обозначается как 23S РНК. Молекулярная масса ее около 10^6 дальтон. В отношении ее коэффициентов седиментации и компактности в изолированном состоянии можно сказать то же, что говорилось при рассмотрении 16S РНК: при ионных силах около 0,1 в отсутствие Mg^{2+} она имеет коэффициент седиментации около 23S и промежуточную компактность; присутствие Mg^{2+} , а также полиаминов, делает ее существенно

более компактной, увеличивая коэффициент седиментации до 31–34S; понижение ионной силы и повышение температуры действуют в противоположном направлении.

Принципиально похожая 23S РНК содержится в большой субчастице 70S рибосом хлоропластов высших растений; однако ее 100-нуклеотидный 3'-концевой фрагмент отщеплен, существуя в виде естественного ковалентно несвязанного 4,5S фрагмента.

В митохондриях грибов и высших растений большая рибосомная субчастица содержит РНК, более крупную, чем бактериальная 23S РНК. В митохондриях млекопитающих ситуация обратная: РНК их большой рибосомной субчастицы существенно меньше, чем бактериальная 23S РНК.

Большая (60S) субчастица эукариотической 80S рибосомы содержит существенно более крупную РНК, чем бактериальная 23S РНК. Эта эукариотическая РНК обозначается как 26S или 28S РНК и имеет молекулярную массу от $(1,2-1,3) \cdot 10^6$ дальтон у грибов и высших растений до $(1,6-1,7) \cdot 10^6$ дальтон у птиц и млекопитающих. Соответственно, цепь 26S РНК *Saccharomyces* состоит из 3392–3393 нуклеотидных остатков, а цепь 28S РНК крысы — из 4700–4800 нуклеотидных остатков. С 26S–28S РНК тесно ассоциирована низкомолекулярная 5,8S РНК, состоящая из 160 нуклеотидных остатков и, как уже указывалось, представляющая собой гомолог 5'-концевой последовательности бактериальной 23S РНК; диссоциация 5,8S РНК от 28S РНК достигается лишь в результате разворачивания под действием температуры или денатурирующих агентов.

5S РНК большой субчастицы

Большая субчастица как прокариотических, так и эукариотических рибосом содержит относительно низкомолекулярную РНК, длиной около 120 нуклеотидных остатков, обозначаемую как 5S РНК. Грамотрицательные бактерии, включая *E. coli*, имеют 5S РНК длиной ровно 120 нуклеотидных остатков, в то время как в большинстве грамположительных бактерий длина 5S РНК составляет 115–116 остатков. Эукариотические 5S РНК тоже, как правило, состоят из 120–121 нуклеотидных остатков, за исключением 5S РНК высших растений, которые на 2–4 остатка короче.

В митохондриальных рибосомах, за исключением рибосом митохондрий высших растений, 5S РНК не найдена.

3. ПЕРВИЧНЫЕ И ВТОРИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ

16S (18S) РНК

16S РНК *E. coli* была первой высокополимерной рибосомной РНК, полная первичная структура которой была установлена. Это было сделано как прямым химико-энзиматическим анализом нуклеотидной последовательности РНК в группе Ж. -П. Эбея, так и путем секвенирования ДНК соответствующего клонированного гена в груп-

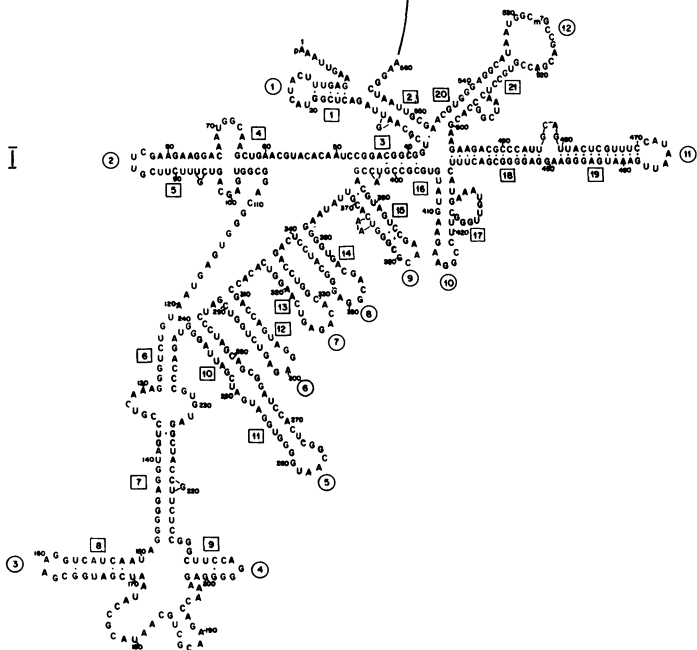
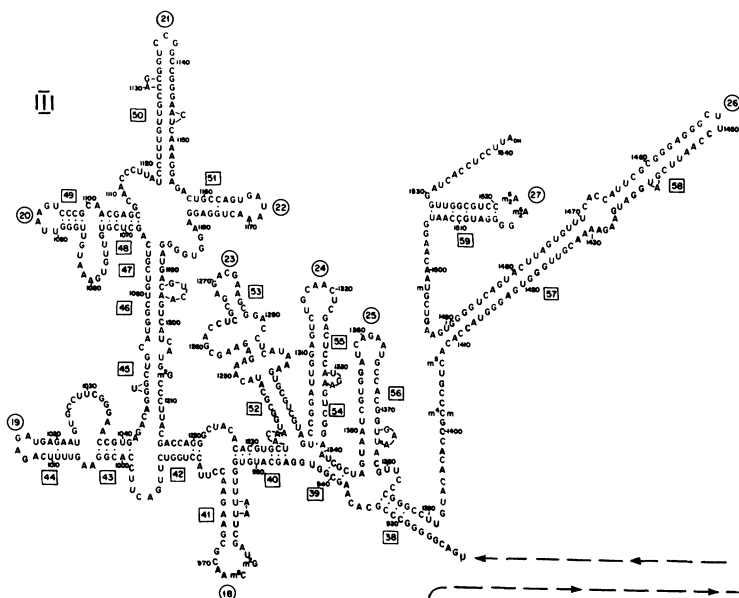
pAAAUUGAAGAGUUGAUC AUGGCUCAGAUUGAACGUGGCGG CAGGCCUAACAC AUGCAAGUCGAACGUAACAGGAAGAAGCUUGCUGCUUUGCUGACG
 50 100
 AGUGGCGGACGGGUGAGUA AUGUCUGGGAACUGCCUAGUGGAGGGGGAUAACUGGAAACGUAAGCUAUUACCGCAU AACUCGCAAGACCAAGAG
 150 200
 GGGGACCUUGCGGCCUUGCCAU CGGAGUGGCCAGAU GGGAUUAGCUAGUAGGUGGGUAACGGCUCACCUUAGGCGCAUGCCUUGCUGGUGUGAGA
 250 300
 GGAUGACCGACCCACUGGAACUGAGACACGGUCCAGACUCCUACGGGAGG CAGCAGUGGGGAUUAUUGCACA AUGGGCGCAAGCCUGAUGCAGCCAUUC
 350 400
 CGCGUGUAUGAAGAAGCCUUCGGGUGUAUAAGUACUUCAGCGGGAGGAGUAAGUUAUUAUCCUUGUCUUAUGACGUUACCCGCAGAGAAG
 450 500
 CACCGGCUAACUCUGGCGCAGCACGm⁷GCGGUAAUACGGAGGGUAAGCGUUAUACGGAUUAUUGGCGUUAAGCGCACGACGCGGUGUUAAGUCA
 550 600
 GAUGUGAAAUCCCGGGCUAACCUUGGAACUGCAUCUGAUUACUGGAGUGAGUCUGUAGAGGGGGUAGAAUUCAGGUGUAGCGGUGAAUUGCG
 650 700
 UAGAGAUUGGAGGAUACCGGUGGCGAAGCGGGCCCCUGGACGAAGACUGACGCUAGUGUGCGAAAGCGUGGGGCAAACAGGAUUAAGUACCCUGG
 750 800
 UAGUCCACGCGGUA AACGAUGUGCAUUGGAGGUUGUGCCUUGAGGCGUGGCUUGCGGACU AACCGGUUAAGUGCAGCGCCUGGGAGUACGGCGGCA
 850 900
 AGGUUAAAACUCAAUGAAUUGACGGGGGCCGCACAGCGUGGAGCAUUGUGGUUUAUUCGAlm²Gm⁵CAACGCGAAGAACUUAACUGGUCUUGACAUCCA
 950 1000
 CGGAAGUUUUCAGAGAUAGAAUGUCCUUCGGGAACCGUGAGACAGGUGUGCAUGGCGUGUGUGUGAUAAGUUGGGUUAAGUCCCGm⁵C
 1050 1100
 AACGAGCGCAACC UUAUCCUUGUUGCGCAGCGGUCGGCCGGGAACUCAAAGGAGACUGCCAGUGAUAAACUGGAGGAAGUGGGGAUGACGUCAAGUC
 1150 1200
 AUCAUGm²GCCCUUACGACGAGGCUACACAGUGCUACAUGGCGCAUACAAGAGAAGCGACUCGCGAGAGCAAGCGGACCUCAUUAAGUUGCUUGUAG
 1250 1300
 UCCGGAUUGGAGUGCAACUGCAUCUCCAUGAAGUCGGAUUCGCUAGUAUUGUGGUAUCAGAAUCCGCCGUGAAUAGUCCCGGGCCUUGUACACACC
 1350 1400
 Gm⁴Cm²CGU m⁵CACACCAUGGGAGUGGUGCAAAGAAGUAGUAGCUUAACCUUCGGGAGGGCGCUUACCCACUUGUGAUUUAUGACUGGGUGAAGUCm⁵UA
 1450 1500
 CAAGGUAAACCGUAGGGGm⁶Am⁵ACCUGCGGUUGGAUACCUCCUUA OH

Рис. 41. Нуклеотидная последовательность рибосомной 16S РНК *E. coli* (по P. Carbon et al., FEBS Lett., 1978, v. 94, p. 152–156; J. Brosius et al. Proc. Nat. Acad. Sci U. S. A., 1978, v. 75, p. 4801–4805)

пе Г. Ф. Ноллера. Полная нуклеотидная последовательность 16S РНК *E. coli* дана на рис. 41.

Естественно, что встал главный вопрос — как уложена эта длинная (1542 остатка) полинуклеотидная цепь в трехмерную структуру? До сих пор этот вопрос, к сожалению, далек от своего полного решения. Тем не менее, попытки выявить элементы пространственной структуры и, в частности, районы двуспиральных участков с комплементарными антипараллельными тяжами (спирали Уотсон — Криковского типа), были немедленно предприняты и дали свои положительные результаты.

Прежде всего, можно более или менее определенно локализовать на первичной структуре РНК те нуклеотидные остатки или олигонуклеотидные районы, которые не участвуют в комплементарном спаривании и вероятнее всего представляют собой однотяжевые секции цепи. Эти районы особенно чувствительны к таким рибонуклеазам, как панкреатическая пиримидил-РНКаза А, грибная гуанил-РНКаза Т₁, бактериальная РНКаза S₁, и к модификации их оснований такими



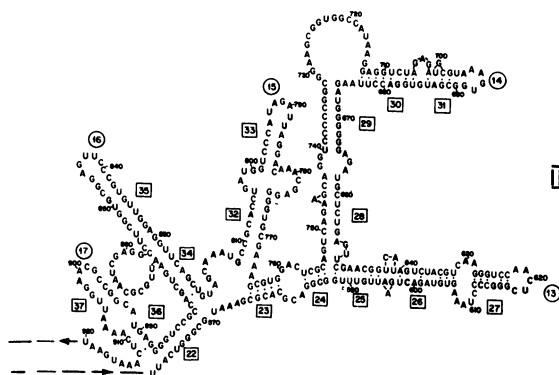


Рис. 42. Вероятная укладка нуклеотидной последовательности рибосомной 16S РНК *E. coli* во вторичную структуру (схема двуспиральных участков) (по H. F. Noller et al. Science, 1981, v. 212, p. 403–411; C. R. Woese et al. Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, p. 2275–2293; P. Stiegler et al. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 2153–2172; C. Glotz, R. Brimacombe, Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, p. 2377–2395):

спиральные участки пронумерованы цифрами в квадратах; шпильки — цифрами в кругах

химическими реагентами, как глиоксаль и кетоксаль (модификация неспаренного G), бисульфит (модификация неспаренного C), *мета*-хлор-пербензойная кислота (модификация неспаренного A). Такая локализация уже позволяет искать смежные взаимно комплементарные участки вдоль первичной структуры РНК, между ее чувствительными точками.

Далее, возможна прямая локализация спаренных участков цепи. Один из наиболее результативных подходов состоит в том, что после переваривания РНКазой, гидролизующей однотяжевые участки РНК, получающиеся двуспиральные фрагменты разделяются в электрофореze сначала в неденатурирующих условиях (первое направление), а затем в условиях диссоциации двуспиральных комплексов (второе направление); таким образом, каждая полоса первого направления, представляющая собой двойную спираль, разделяется во втором направлении на два пятна, представляющих собой комплементарные тяжи, которые идентифицируются и локализуются на первичной структуре РНК. Таким путем удастся выявить не только смежные (вдоль цепи) комплементарные участки, но и комплементарные взаимодействия между удаленными участками цепи РНК. Другой подход, особенно эффективный в выявлении дальних взаимодействий, состоит в фотоактивируемых сшивках оснований спаренных тяжей в составе структуры РНК с последующей идентификацией сшитых олигонуклеотидов.

Наконец, двуспиральные участки, предсказанные на основании комплементарности смежных или удаленных секций цепи, могут быть подтверждены или отвергнуты путем сравнительного анализа гомологичных РНК. Дело в том, что структуры РНК оказались эволюционно сильно консервативны. Изучение 16S РНК других бактерий и хлоропластов показало большую степень гомологии их первичных структур, наряду, конечно, с многочисленными нуклеотидными заменами. Если, несмотря на эти замены, в другой 16S РНК сохраняется комплементарность между теми же секциями и, соответственно, предсказанные спиральные участки занимают те же положения, то это сильно подтверждает реальность локализации данных спиралей. Совпадение в нескольких различных 16S РНК делает локализацию совсем убедительной.

Итак, совокупность вышеперечисленных экспериментальных и теоретических подходов дала возможность построить модель вторичной структуры 16S РНК *E. coli*, представленную на рис. 42. Почти идентичные модели получены для 16S РНК других бактерий, хлоропластов высших растений и архебактерий. Несмотря на большой размер и гораздо меньшую гомологию последовательности, цепи 18S РНК цитоплазматических 80S рибосом эукариотических организмов могут быть уложены в виде схемы вторичной структуры, очень сходной с таковой 16S РНК бактерий, но 18S содержит добавочные спирали и их группы (рис. 43). Рибосомные РНК уменьшенного размера, а именно 12S РНК митохондрий млекопитающих, также оказались гомологичны бактериальной 16S РНК; основная схема их укладки во вторичную структуру совпадает с таковой 16S РНК

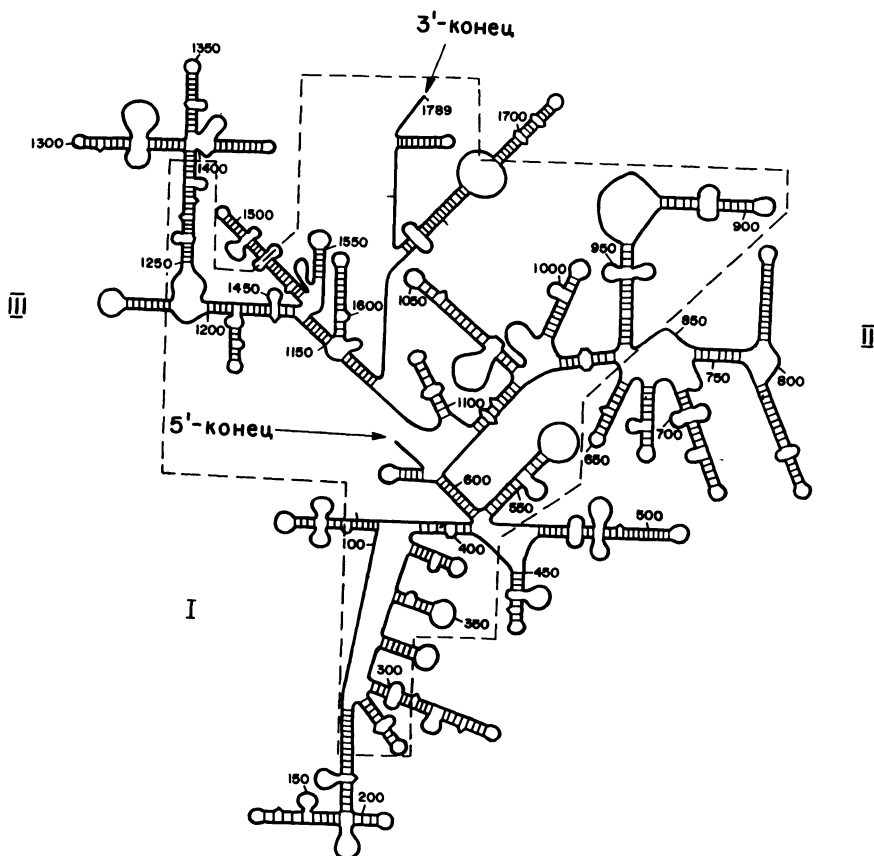


Рис. 43. Схема вероятной вторичной структуры рибосомной 18S РНК дрожжей (по А. С. Манькин и др. Докл. АН СССР, 1981, т. 256, с. 1006–1010; C. Zwieb et al. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 3621–3640). (подобным же образом укладывается 18S РНК животных):

пунктиром обведена консервативная часть, наблюдаемая во всех высокополимерных РНК малой рибосомной субчастицы, включая наиболее редуцированную митохондриальную 12S РНК млекопитающих

бактерий и 18S РНК эукариот, но имеются делеции спиралей и более обширных участков. На рис. 43 пунктиром обведена консервативная часть вторичной структуры высокополимерной РНК малой рибосом-субчастицы, более или менее общая для эукариот, бактерий и мито-хондрий млекопитающих.

Следует указать на следующие главные черты вторичной струк-туры высокополимерной рибосомной РНК, выявляемые на модели для 16S РНК *E. coli* и, по-видимому, являющиеся общими для других случаев.

1. В комплементарном взаимодействии с образованием двуспи-

ральных структур Уотсон—Криковского типа участвует не менее половины всех нуклеотидных остатков цепи.

2. Внутрицепочечные двуспиральные участки являются относительно короткими. Длина непрерывных спиралей редко превышает размер одного полного витка, т. е. 10—12 пар нуклеотидов, а средняя длина составляет около 7—8 нуклеотидных пар. Всего в 16S РНК *E. coli*, согласно приведенной схеме вторичной структуры (рис. 42), можно насчитать около 60 спиралей (обозначены номерами в квадратах), т. е. в среднем одна спираль на 25—30 нуклеотидных остатков.

3. Кроме стандартных Уотсон—Криковских пар оснований, а именно G·C и A·U, для спиралей рибосомной РНК оказались характерными пары G·U. В составе спиралей рибосомной РНК, как и в тРНК, изредка могут встречаться пары G·A, а также «противостояния» A C и U U. Неканонические пары чаще встречаются в длинных спиральях РНК (в самой длинной спирали 3'-концевого района 16S РНК *E. coli*, состоящей из 22 пар оснований, имеется 7 пар G·U и 3 пары G·A!).

4. В спиральях рибосомной РНК встречаются одно- и двунуклеотидные боковые петли (с одного бока); это почти всегда пуриновые нуклеотиды (см., например, G³¹, A⁷⁴⁶, A¹⁴⁴¹, AA⁹⁵⁸⁻⁹⁵⁹). Плоскости оснований таких петель могут ориентироваться перпендикулярно плоскостям оснований спирали (т. е. параллельно оси спирали) и, таким образом, служить гидрофобными площадками для стэкинг-взаимодействия бока спирали с другими участками РНК при формировании третичной структуры. (Встречаются также и более длинные боковые петли — от 3 до 10—14 нуклеотидных остатков; они, однако, будут, скорее всего, формировать собственную структуру, так что такие места, по-видимому, лучше рассматривать как перерывы в спиральях.)

5. Преобладающим типом спиралей являются «шпильки», т. е. спирали, образованные комплементарным взаимодействием смежных участков цепи. Согласно модели (рис. 42), в 16S РНК *E. coli* их насчитывается 27 (обозначены номерами в кружках). К «шпилькам» часто примыкают спиральные участки, отделенные от шпильки лишь коротким некомплементарным участком (последний может представлять собой структуру какого-то иного типа); в целом «шпилька» и примыкающая к ней спираль могут образовывать единую «составную спираль». На модели 16S РНК *E. coli* такие «составные шпильки» образованы спиралями 4 и 5; 10 и 11; 16 и 17; 18 и 19; 20 и 21; 25, 26 и 27; 28, 29, 30 и 31; 32 и 33; 34 и 35; 36 и 37; 43 и 44; 48 и 49; 52 и 53; 54 и 55; 57 и 58; таким образом, «составные шпильки» покрывают значительную часть всей вторичной структуры.

6. Имеется несколько дальних комплементарных взаимодействий, спаривающих отдаленные районы полинуклеотидной цепи. Наиболее важными в общем сворачивании 16S РНК *E. coli* и обособлении ее доменов являются три дальних комплементарных контакта: между участками последовательности 27—37 и 547—556 (спираль 2), между участками 564—570 и 880—886 (спираль 22) и между участками 926—933 и 1384—1391 (спираль 38). Двойные спирали в этих

местах скрепляют начало и конец отрезков полинуклеотидной цепи, образующих обособленные домены структуры РНК (см. ниже). Следует отметить также «менее дальние» комплементарные взаимодействия: между участками 39—47 и 394—403 (спираль 3), между участками 576—580 и 761—765 (спираль 23) и между участками 946—953 и 1228—1235 (спираль 40); здесь также образуются важные двойные спирали, стабилизирующие сворачивание РНК в доменную структуру.

16S РНК содержит несколько посттранскрипционно модифицированных (минорных) нуклеотидных остатков (см. рис. 14), и почти все они локализуются именно в неспаренных участках цепи, в основном в 3'-концевой трети молекулы. В 16S РНК *E. coli* имеются m^6A (два заблокированных остатка в петле 3'-концевой шпильки, положения 1518—1519), m^7G (один остаток, положение 527), m^2G (два остатка, положения 966 и 1207), m^5C (два остатка, положения 967 и 1407), m^4C (один остаток, положение 1402) и mU (положение 1498). Многие из этих минорных остатков эволюционно консервативны и наблюдаются у других бактерий. Интересно, что 3'-концевая шпилька, включающая спираль из 10 пар нуклеотидов, оказывается инвариантной для известных 16S и 18S РНК, и два заблокированных m^6A в торцевой петле шпильки также обязательно присутствуют как у прокариот, так и у эукариот.

Модифицированным остатком, а также нуклеотидным петлям спиралей приписывают важную роль в организации участков молекулы, узнаваемых белками, и в участии в функциональных центрах рибосомы.

23S (28S) РНК

Первичная структура рибосомной 23S РНК *E. coli* также была установлена как ее прямым химико-энзиматическим анализом, так и путем секвенирования ДНК ее клонированного гена (рис. 44). Одновременно и некоторое время спустя были секвенированы также высокополимерные РНК большой рибосомной субчастицы ряда других организмов, а также хлоропластов и митохондрий, которые дали материал для сравнительно-эволюционного анализа. Весь арсенал методов, примененный в случае 16S РНК, был использован для изучения вторичной структуры 23S РНК, и были найдены принципиально те же закономерности и особенности. Схема модели вторичной структуры 23S РНК *E. coli* дана на рис. 45. Как и в 16S РНК, около половины или более остатков цепи 23S РНК оказываются вовлеченными в двойные спирали. Всего можно насчитать несколько более 100 индивидуальных спиралей. Наиболее ярким отличием от 16S РНК является, по-видимому, комплементарное спаривание 5'-конца 23S РНК с ее 3'-концом; довольно стабильная совершенная двойная спираль из 8 пар нуклеотидов удерживает оба конца вместе, в значительной мере фиксируя общую свернутость цепи в конечную компактную структуру. Как и в 16S РНК, пары $G \cdot U$ не редкость в спиральных 23S РНК. Кроме того, в спиральных имеются пары $G \cdot A$ и,

GGUUAAGCGACUAAGCGUACACGGUGAUGCCUUGCGAGUCAGAGGCGAUGAAGGACGUGCUAAUUCUGCGAUAAAGCGUUAAGGUGAUUAAGACCGU
50 100
AUAAACCGGCGAUUUUCGAUUGGGGAAACCCAGUGUGUUCGACACACUAUUAACUGAAUCCAUAGGUAUUAUGAGCGAACCAGGGGGAACUGAAACAU
150 200
CUAAGUACCCCGAGGAAAAGAAUACAACCGAGAUUCCCCAGUAGCGGCGAGCGAAGCGGGAGCAGCCAGAGCCUGAAUACAGUGUGUGUUAUGUGAA
250 300
GCGUUGGAAAGCGCGCGAUACAGGUGAGACGCCCCGUACACAAAAGUACACUUGAGUGAGUGAGUGAGGCGGGGACAGUGGUAUCCUGUGUG
350 400
AAUUAUGGGGGACCAUCCUCCAAGGCUAAAUUACUCCUGACUGACCGAUUAGUAAACAGUACCGUGAGGGAAAGCGAAAGAACCCCGCGAGGGGAGUG
450 500
AAAAAGAACCGUAAACCGUGUACGUAACGAGUGGGAGCACGCUUAGGCGUGUACUGCGUACCUUUUUAUUAUUGGUGACGCGCUAAUUAUUCUGUAG
550 600
CAAGGUUAAACCGAUAUGGGGAGCCGAAGGGAAACCGAGUUAUACUGGGGCUUUAAGUUGCAGGGUUAUAGACCGGAACCCCGUGUACUAGCCAUAGGGCAG
650 700
GUUGAAGGUUGGUAACACUAACUGGAGGACCGAACCGACUAAUUGTGAUUAUUAUGCGAUGACUUGUGGUGGGGUGAAAGCCAAUCAAACGGGA
750 800
GAUAGCUGGUUCCCGGAAAGCUUUAUUGAGUGAGCGCCUUGGAAUUAUCCCGGGGUGAGACACUGUUAUGCGAAGGGGUGAUCUCCGACUUAACAA
850 900
CCGAGUGCAAACUGCGAAUACCGGAGAAUUAUACCGGAGACACACGCGGGUGCUAACGUGCUGUGAAGAGGGAACAACCCAGACCGCCAGCUA
950 1000
AGGUCCCAAGUACUGGUAUAGUGGGAACGAGUGGGGAAGGCCAGACAGCCAGGAGUUGGCUUUAAGAGCAGCCAUUUAUUAAGAAAGCGUAUAGC
1050 1100
UCACUGGUGAGUGCGCCUGCGGGAAGUUAACGGGGCUAAACCAUGCACCAGGACUGCGGACGACGCUUUAUGCGUUGGUGAGGGGAGCGUUC
1150 1200
UGUAAGCCUGCGAAGGUGUGUGAGGCAUGCUGGAGGUUAACAGAGUGCGAAUGCUGACAUAGUAACGUAUAAAGCGGGUAAAAGCCCGCUGCGCG
1250 1300
AAGACCAAGGGUCCUGUCCAACGUAUACGGGGCAGGGUGAGUGACCCCUAAGGCGAGGCGAAAGCGGUAGUGAUGGGAACAGGUUAUUAUUCU
1350 1400
GUACUUGGUGUUAUCUGAAGGGGGACGGAGAAGCUUUGGCGGGGACGGUUGUCCGGUUAAGCGUGUAGGCGUGUUAUCCAGGCAAUCCG
1450 1500
GAAAUUAAGGCGUGAGGCGUGAGCAGGACUACUGGUGUGAAGCAACAAUUGCCUGUCCAGGAAAAGCCUCUAAGCAUAGGUACUAUCAAUUC
1550 1600
GUACCCCAACCGACACAGGUGUGAGGAGAAUACCAAGGCGUUGAGAGAAUUCGGUGAAGGAAUAGGCAAAUUGGCGUUAUUCUGGGAGA
1650 1700
AGGCAUGUGAUUAGUAGUGUAGUCCUGCGAUGGAGUGAAAUACUGGAAGAUACAGCUGGUGCAACUGUUUAUUAUAAACACAGCACUGUG
1750 1800
AAACACGAAAGUGGACGUUAUACGUGUGACGCCUGGCCGUGCGGAAGGUUAUUAUGAGGGGUAAGCGCAAGCGAAGCUCUUGAUGAAGCCCGCGUAA
1850 1900
ACGGCGGCCGAAACUAUAAACGUGCUUAGGUGAGCGAAATUCCUUGUGGGUAAUGUCCGACCUACGAGAAUGGCGUAUAGUAGGCCAGGUGUCCUCCAC
1950 2000
CGAGACUCAGUGAAUUAAGUACUGCUGUGAAGAUAGCAGUGUACCCGCGGCAAGACGGAAGACCCCGUAAACUUAUACUUAUAGCUUGACACUAGACAUUG
2050 2100
AGCCUUAUGUGUAGGUAUGGAGGAGGCUUUAAGUGUGAGCGCCAGUUGCAGUAGGAGCGACCUUGAAUACCAACCCUUAUUAUGUUGUUGUUAUAC
2150 2200
GUUGACCCGUAAUCCGGUUGCGACAGUGUGUGGUGUUAUGACUGGGCGGUCUCCUUAAGAGUAACGAGGAGCACGAAGGUUGGCUUAUC
2250 2300
CUGGUGGACAUACAGGAGGUAGUGCAUUGGCAUAAAGCCAGCUUGACUGCGAGCGUGACGCGGAGCGAGGUGCGAAAGCAGGCUUAUAGUUAUCCGGUG
2350 2400
UUCUGAAUGAAGGGCCAUUCGCUAACGGAUAAAGGUACUCCGGGGUAACAGGCGUAUACCGCCCAAGAGUUAUUAUAGCAGCGCGUGUUGGCAACU
2450 2500

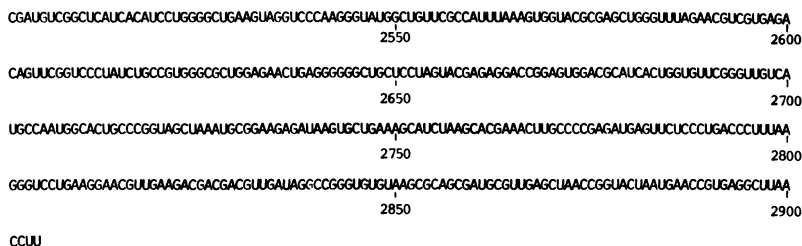


Рис. 44. Нуклеотидная последовательность рибосомной 23S РНК *E. coli* (по J. Brosius et al. Proc Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1980, v. 77, p. 201–204; C. Branlant et al. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 4303–4324)

более редко, некоторые другие неканонические пары. В спиралях встречаются одно- и динуклеотидные боковые петли, чаще всего с А (но бывают и другие).

В качестве посттранскрипционно модифицированных (минорных) нуклеотидов 23S РНК *E. coli* имеет Ψ (3 остатка), Т (2 остатка), m^6A (2 остатка), m^1G , m^7G , Gm, Cm и неидентифицированные производные U. Часть их заблокирована, как например, в последовательностях 745–747 ($m^1G\Psi T$) и 1911–1917 ($\Psi A A C U * A \Psi$), а часть рассеяна, но почти исключительно (кроме одного Ψ и одного Т) в однотяжевых районах.

Как и в случае малых высокополимерных РНК, эукариотические 26S–28S РНК оказываются гомологичными, особенно по вторичной структуре, бактериальной 23S РНК, но имеют ряд крупных вставок. В 28S РНК млекопитающих, которая на 1500 нуклеотидов длиннее 26S РНК дрожжей, характерной чертой является существование ряда G + C-богатых сегментов, по-видимому, сильно структурированных и вставленных в эволюционно консервативные участки; иногда они образуют очень длинные спирали. Наиболее принципиальным отличием эукариотических рибосомных РНК большой субчастицы является существование 5'-концевого 160-нуклеотидного фрагмента в виде отдельной цепи 5,8S РНК (рис. 46). Однако эукариотическая 5,8S РНК так тесно встроена в структуру 28S РНК, будучи спарена с ней в стабильные спирали, по-видимому, в трех местах, что говорить о ней как о структурно самостоятельной молекуле не приходится. Действительно, 5,8S РНК образует сама и с 28S РНК вторичную структуру, подобную той, что выводится для ковалентно-непрерывной 5'-концевой части бактериальной 23S РНК (см. раздел 4 этой главы).

5S РНК

Полные первичные структуры 5S РНК как прокариот (*E. coli*), так и эукариот (человек) были определены задолго до работ по структуре высокополимерных рибосомных РНК, еще в 1967 г. (в группах Ф. Сэнгера и С. М. Вейсмана, соответственно). С тех пор стали известны многие десятки первичных структур 5S РНК из рибосом

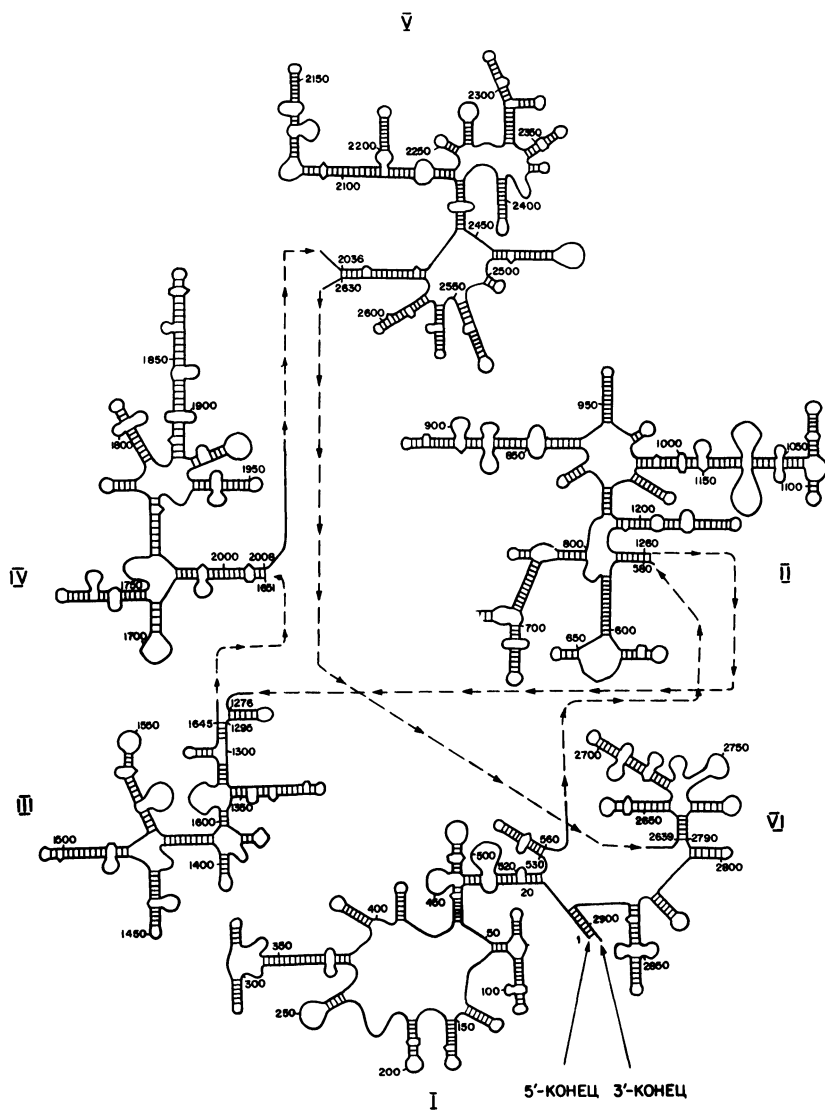


Рис. 45. Схема вероятной вторичной структуры рибосомной 23S РНК *Escherichia coli* (по C. Branlant et al. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 4303-4324; C. Glotz et al. Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 3287-3306; H. F. Noller, et al., Nucleic Acids Res., v. 9, p. 6167-6189)
23S РНК разделена на шесть доменов, обозначенных римскими цифрами

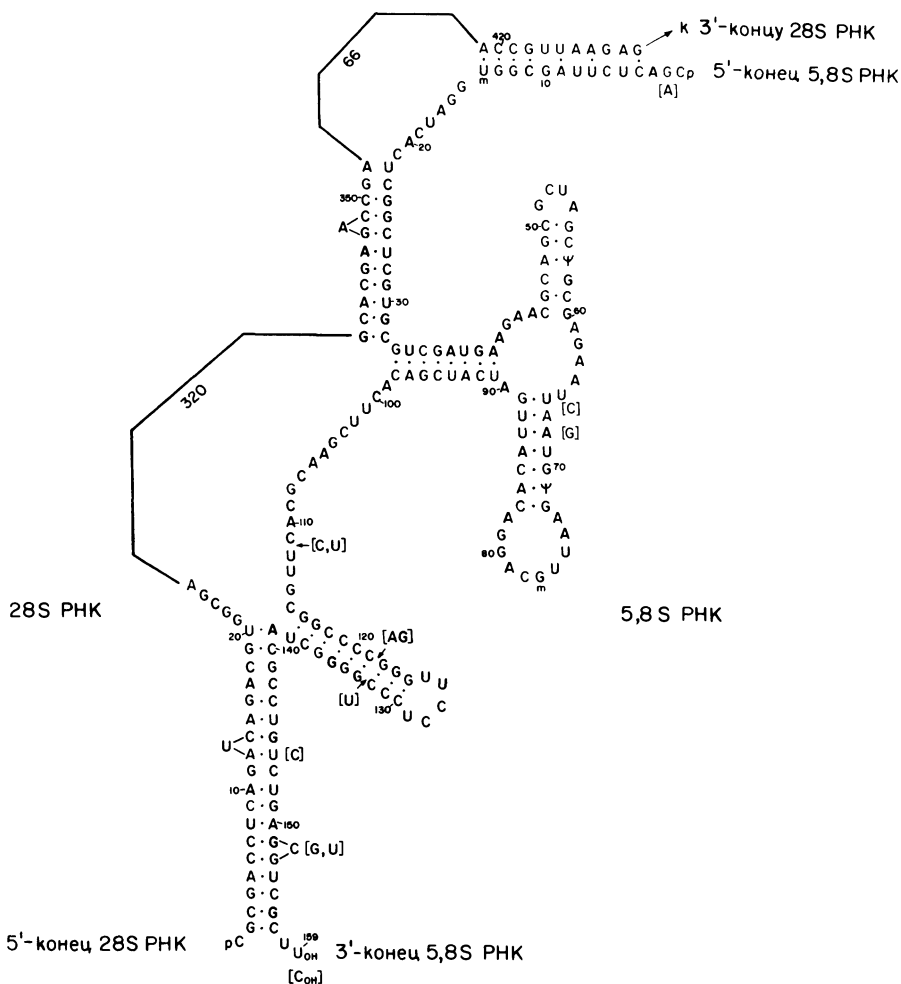


Рис. 46. Нуклеотидная последовательность и схема вероятной вторичной структуры рибосомной 5,8S РНК эукариот (животных):

за основу взята последовательность 5,8S РНК млекопитающих (по R. N. Nazar et al. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, p. 8591-8597); в скобках даны замены или вставки нуклеотидов, которые могут наблюдаться в 5,8S РНК других таксонов животных — птиц, рептилий, земноводных или рыб (V. A. Erdmann, Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. r25-r42); показано возможное комплементарное спаривание 5,8S РНК с 5'-концевым доменом рибосомной 28S РНК мыши (по T. A. Walker et al. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, p. 333-338)

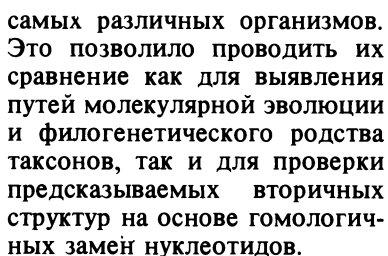


Рис. 47. Обобщенная схема вторичной структуры рибосомной 5S РНК:
 пять спиральных участков молекулы 5S РНК обозначены римскими цифрами

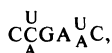
Одновременно с определением первичных структур 5S РНК делались многочисленные попытки предсказать ее вторичную структуру. Тестирование однотяжевых участков с помощью нуклеаз и химических агентов, модифицирующих неспаренные основания, давало экспериментальную основу для этих попыток. Но решающим здесь все-таки следует признать сравнительный подход, основанный на укладке многочисленных известных первичных структур 5S РНК в однотипные вторичные структуры. Действительно, все известные первичные структуры 5S РНК можно уложить за счет самокомплементарности их участков по схеме, показанной на рис. 47 (схема обобщает принципиально похожие модели вторичной структуры, предложенные рядом авторов). На рис. 48 даны конкретные первичные и вероятные (предсказанные) вторичные структуры 5S РНК шести представителей главных царств (эволюционных ветвей) живого мира — граммотрицательных бактерий (*E. coli*) (а), грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis*) (б), метабактерий, или архебактерий (*Sulfolobus acidocaldarius*) (в), растений (*Secale cereale*) (г), грибов (*Saccharomyces cerevisiae*) (д) и животных (*Homo sapiens*) (е).

Прежде всего, в 5S РНК 5'-концевой участок цепи комплементарен 3'-концевому участку и образует с ним прочную длинную двойную спираль из 9—11 пар нуклеотидов (спираль I). Вся внутренняя нуклеотидная последовательность укладывается в две составные шпильки. Одна составная шпилька четко разделяется на два двуспиральных участка — собственно шпильку из 6 пар нуклеотидов с большой торцевой петлей из 11—13 остатков в районе 40-го нуклеотида (спираль III) и двуспиральный участок из 7—8 нуклеотидных пар (спираль II), соединенный с предыдущей спиралью некомплементарным районом. Другая составная шпилька с маленькой торцевой петлей из 2—4 нуклеотидных остатков представляет собой почти непрерывную двойную спираль, но, как правило, содержащую несколько дефектов, таких как неканонические пары, выпетливающиеся нуклеотидные остатки и, часто, неспаренные нуклеотиды в середине; поэтому она обычно может быть разбита на две подспирали (спираль IV и спираль V).

Общие особенности вторичной структуры 5S РНК те же, что были отмечены для высокополимерных РНК (см. раздел Б.11, 3). Особо следует подчеркнуть встречаемость таких неканонических пар, как G·U и G·A. Кроме того, во всех внутренних спиралях (II—V) часто встречаются одонуклеотидные и дунуклеотидные боковые петли; в большинстве случаев выпетливаются А, но бывают и другие остатки.

Из данных по доступности нуклеазам и химическим реагентам следует, что большая торцевая петля спирали III и неспаренный район между спиралями II и III, а также «плохо спаренные» остатки составной спирали IV—V, не просто развернуты, а довольно сильно структурированы; предполагается их участие в организации третичной структуры 5S РНК, которая пока не известна.

Интересно, что торцевые и боковые петли часто характеризуются более консервативной первичной структурой, чем спиральные участки. Большая торцевая петля спиральной шпильки III содержит полуинвариантную последовательность:



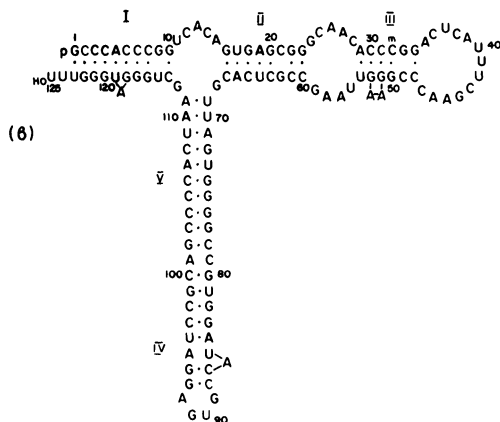
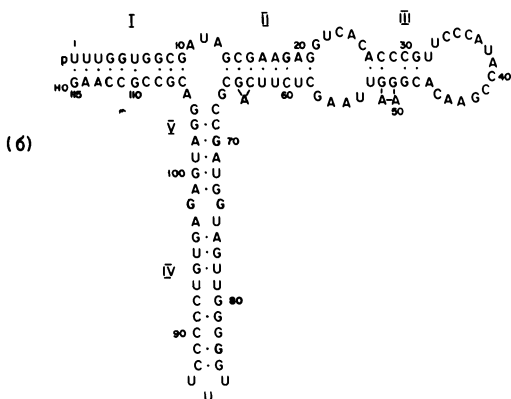
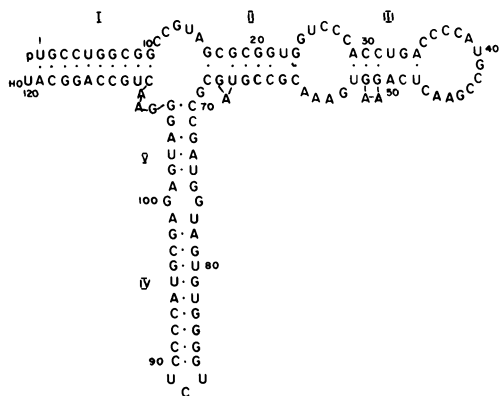
непосредственно примыкающую к спиральному участку (у всех прокариот она CCGAAC, у растений CAGAAC, у грибов CCGAUC, а у позвоночных животных CUGAUC). Ее тетрануклеотидная часть $\text{GA} \text{U} \text{C}$, примыкающая к спирали, недоступна нуклеазам, т. е. по-видимому, структурирована. Через четыре остатка от нее по направлению к 3'-концу имеется полуинвариантная дунуклеотидная боковая петля — чаще всего AA, но у грибов UA, Ψ A или CA (CA также у некоторых высших растений). Характерно, что эта петля всегда фланкирована двумя G, которые спарены в противоположном тяже с двумя смежными C, обеспечивая, по-видимому, скрепление двойной спирали в месте петли. Далее через три остатка по направлению к 3'-концу всегда присутствует еще инвариантный дуплет AA, теперь уже в неспиральном районе, между спиралями II и III.

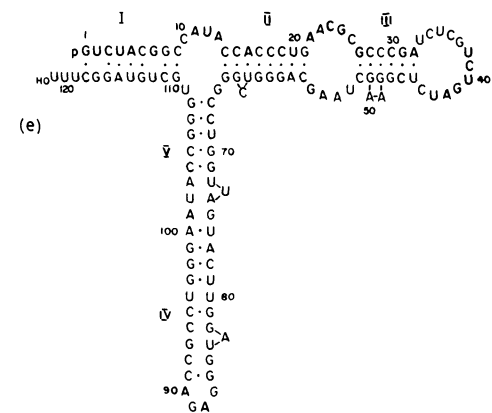
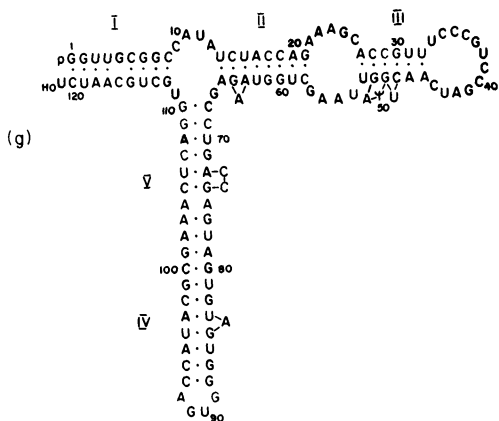
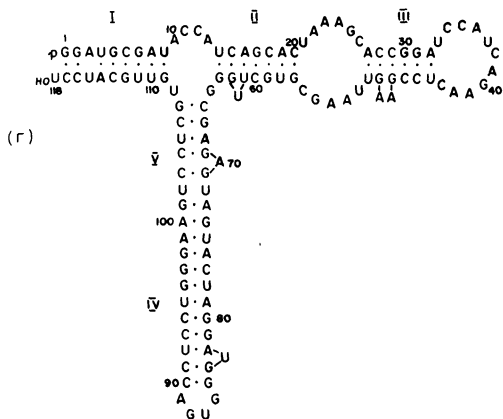
В спирали II, в ее 3'-тяже, почти всегда имеется инвариантная однонуклеотидная боковая петля — у прокариот и грибов, как правило, А (у архебактерий может отсутствовать), у растений — U, у животных — C; за ней всегда следует G, спаренный с C противоположной цепи.

4. СТРУКТУРНЫЕ ДОМЕНЫ И КОМПАКТНАЯ САМОУКЛАДКА МОЛЕКУЛ РНК

Прочное спаривание 5'- и 3'-концевых участков цепи является, по-видимому, характерным свойством стабильных структур РНК. Образование такой черешковой спирали завершает сворачивание пространственной структуры и фиксирует ее. В принципе фиксация концов должна неизбежно приводить к стабилизации внутренних спиралей и других типов укладки. Замыкание концов друг на друга вносит еще и дополнительный вклад в компактизацию структуры.

тРНК являются первым известным примером такой организации. Из предыдущего раздела видно, что рибосомные 5S РНК тоже имеют прочную черешковую спираль, образованную 5'- и 3'-концами ее цепи и, очевидно, фиксирующую ее общую укладку. В высокополимерных рибосомных РНК существование прочной (совершенной и достаточно длинной) спирали, образованной удаленными





участками цепи, может служить верным признаком относительно независимой, компактно свернутой структуры участка цепи между ними. Такие samozавершенные структурные домены, с прочным спариванием их 5'- и 3'-концов, являются важнейшим конформационным мотивом обеих высокополимерных рибосомных РНК.

16S (18S) РНК

Молекула как 16S РНК прокариот, так и 18S РНК эукариот может быть подразделена на 3 главных домена: 5'-концевой (домен I), ограниченный и скрепленный черешковой спиралью из 10—11 нуклеотидных пар (спираль 2, образованная последовательностями 27—37 и 547—556 в случае 16S РНК *E. coli*, см. рис. 42); серединный (домен II), имеющий черешок из 7 нуклеотидных пар (спираль 22, образованная последовательностями 564—570 и 880—886 у *E. coli*); 3'-проксимальный (домен III), ограничен-

Рис. 48. Нуклеотидные последовательности рибосомных 5S РНК (V. A. Erdmann, *Nucleic Acids Res.*, 1981, v. 9, p. r25—r42) и их вероятная укладка во вторичные структуры у представителей шести главных ветвей эволюции:

а — граммотрицательная бактерия (*Escherichia coli*); б — грамположительная бактерия (*Bacillus subtilis*); в — архебактерия (*Sulfolobus acidocaldarius*); г — растение (рожь, *Secale cereale*); д — гриб (дрожжи, *Saccharomyces cerevisiae*); е — животное (человек, *Homo sapiens*). Двуспиральные участки пронумерованы римскими цифрами

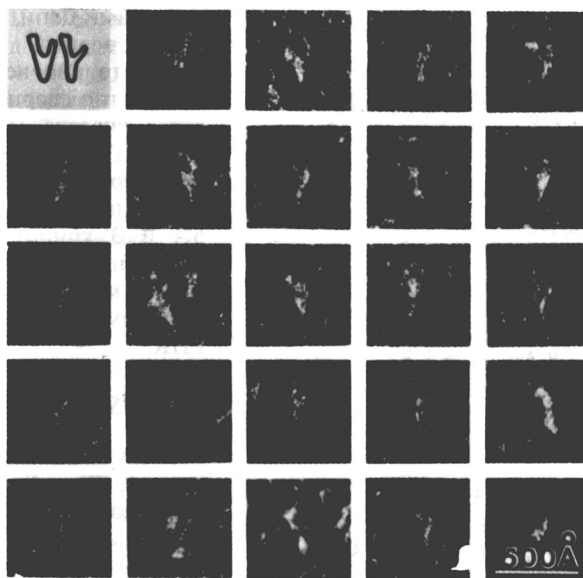


Рис. 49. Электронные микрофотографии индивидуальных молекул изолированной рибосомной 16S РНК *E. coli* в компактной форме и их Y-образные контуры (слева вверх) (предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушино):

РНК высушена из замороженного состояния и контрастирована путем оттенения металлом (как описано в подписи к рис. 33)

ный черешком из 7–8 нуклеотидных пар (спираль 38, образованная последовательностями 926–933 и 1384–1391 у *E. coli*). Внутри домена I можно выделить субдомен, ограниченный спиралью из 6–9 нуклеотидных пар (спираль 3, образованная последовательностями 39–47 и 394–403 у *E. coli*). Точно так же в домене II имеется субдомен, ограниченный своим черешком (спираль 23, последовательности 576–580 и 761–765 у *E. coli*). В домене III тоже выделяется субдомен с черешком из 8–10 нуклеотидных пар (спираль 40, образованная последовательностями 946–953 и 1228–1235 у *E. coli*). Интересно, что указанные субдомены внутри доменов имеют тенденцию захватывать 5'-концевую часть соответствующего домена; не исключено, что это является правилом, облегчающим сворачивание РНК с 5'-конца: возможно, субдомен — компактное ядро, на которое затем уже наворачивается последующая структура домена. Сама 3'-концевая последовательность 16S или 18S РНК длиной более 150 нуклеотидных остатков не входит в состав перечисленных доменов, но тоже сильно структурирована (иногда обозначается как дополнительный домен IV); главный элемент ее структуры — относительно длинные и стабильные двуспиральные участки (3'-концевая универсальная шпилька из 10 пар нуклеотидов и очень длинная составная шпилька, включающая около 30 пар нуклеотидов).

Электронная микроскопия изолированной 16S РНК в условиях, когда она компактно сложена (присутствие достаточного количества Mg^{2+} , спермидина и т. п.), позволяет, по-видимому, разрешить указанные 3 главных структурных домена. Эта РНК видна как Y-образная структура, с неравными ветвями (рис. 49). Другими словами, видны три компактные лопасти или доли, исходящие из центра. Если сравнить размеры и общую морфологию Y-образной РНК с таковыми рибосомной 30S субчастицы, то можно видеть, что она хорошо вписывается в

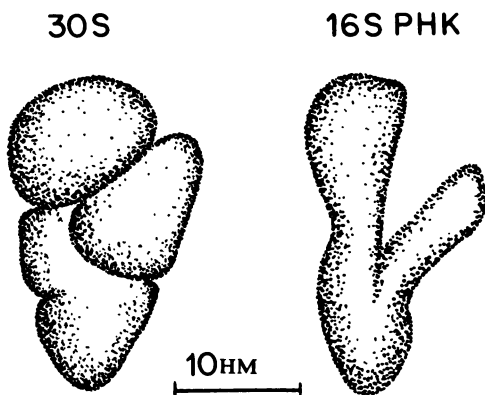


Рис. 50. Сравнение контуров рибосомной 30S субчастицы и ее изолированной 16S РНК в компактной форме по данным электронной микроскопии

последнюю (рис. 50). Тогда, зная локализацию обоих концов 16S РНК на 30S субчастице и локализацию ряда рибосомных белков на первичной структуре 16S РНК и на поверхности 30S субчастицы (см. следующую главу), можно идентифицировать видимые ветви, или доли, Y-образной РНК с ее тремя структурными доменами, выводимыми из первичной и вторичной структуры. По-видимому, нижняя ветвь буквы Y представляет собой 5'-концевой домен I, формирующий «тело» 30S субчастицы. Верхняя длинная ветвь Y-образной РНК является, скорее всего, 3'-проксимальным доменом III, входящим в состав «головки» 30S субчастицы. Верхняя короткая ветвь Y может быть срединным доменом II и участвовать в образовании боковой лопасти («платформы») 30S субчастицы. Согласно прямой иммуно-электронно-микроскопической локализации 3'-конец 16S РНК занимает место где-то между «головкой» и верхушкой боковой лопасти, т. е., по-видимому, между концами верхних ветвей Y-образной РНК.

Поразительным является тот факт, что общая форма изолированной РНК в компактном состоянии оказалась специфической и напоминающей форму исходной 30S субчастицы (или, по крайней мере, вписывающейся в нее). Это говорит о том, что, во-первых, цепь рибосомной РНК сама, без белков, способна не только образовывать локальные вторичные структуры, но и укладываться в целом, задавая морфологически уникальную конформацию всей молекулы; во-вторых, именно эта самоупкладка рибосомной РНК прежде всего определяет размеры, общую форму и ряд главных морфологических черт рибосомной субчастицы.

23S (28S) РНК

Цепь рибосомной 23S (28S) РНК складывается в 6 (или 7) структурных доменов, ограниченных, как и в предыдущем случае, черешко-

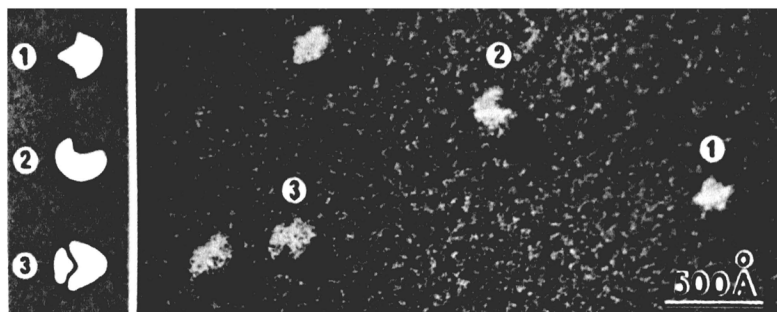


Рис. 51. Электронная микрофотография молекул изолированной рибосомной 23S РНК *E. coli* в компактной форме и их контуры (слева) (предоставлена В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушкино): три различных проекции пронумерованы цифрами 1, 2 и 3. РНК высушена из замороженного состояния и контрастирована путем оттенения металлом (как описано в подписи к рис. 33)

выми спиралями, образуемыми парным взаимодействием удаленных участков цепи (см. рис. 45).

В прокариотических 23S РНК домен I образован 5'-концевой последовательностью приблизительно из 500 нуклеотидных остатков. В эукариотических 28S РНК домен I образуется при взаимодействии с 5,8S РНК, представляющей собой, как уже отмечалось выше, гомолог 160-нуклеотидной 5'-концевой последовательности прокариотических 23S РНК. В последнем случае 3'-концевая последовательность 5,8S РНК прочно спаривается на большом протяжении (15–17 нуклеотидных пар) с 5'-концевой последовательностью 28S РНК,

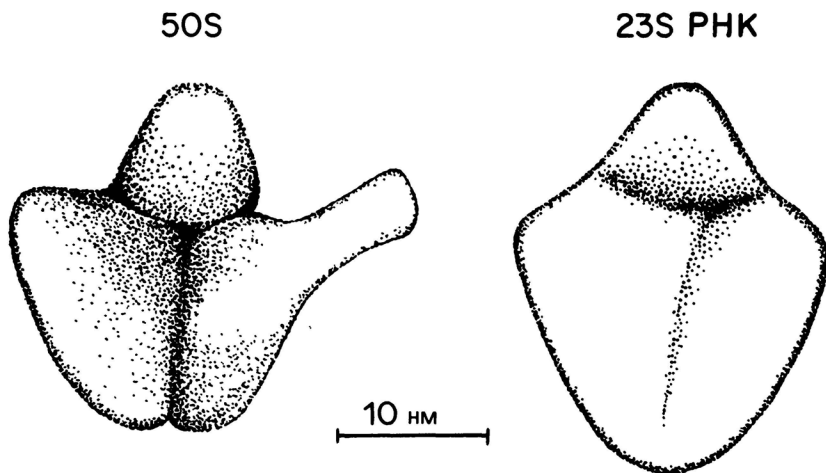


Рис. 52. Сравнение контуров рибосомной 50S субчастицы и ее изолированной 23S РНК в компактной форме, по данным электронной микроскопии

обеспечивая как бы их сращивание (см. рис. 46); с другой стороны, 5'-проксимальная (в районе 20–30 нуклеотидного остатка) последовательность 5,8S РНК, по-видимому, спаривается с внутренним участком цепи 28S РНК, образуя черешок домена I.

Как и в случае 16S (18S) РНК, довольно протяженная 3'-концевая последовательность 23S (28S) РНК не входит в состав главных доменов, а лишь образует несколько спиральных шпилек. В 23S РНК бактерий 110-нуклеотидная 3'-концевая последовательность сложена в три шпильки (две простые и одна составная из двух спиралей, разделенных неспаренным участком, см. рис. 45). В рибосомах хлоропластов высших растений 100-нуклеотидная 3'-концевая последовательность в цепи 23S РНК отсутствует и представлена в виде отдельной цепочки 4,5S РНК. 4,5S РНК складывается в две шпильки (одна простая и одна составная из двух спиралей), гомологичные (даже почти идентичные) 3'-концевым шпилькам 23S РНК бактерий.

Уже отмечалось выше (раздел 3 этой главы), что в 23S РНК бактерий самый 5'-конец цепи спарен с ее 3'-концом (совершенная стабильная спираль из 8 нуклеотидных пар). Соответственно, в рибосомах хлоропластов высших растений 5'-конец 23S РНК спарен в такую же спираль с 3'-концом 4,5S РНК. В рибосомах эукариотических организмов 3'-конец высокомолекулярной 28S РНК, по-видимому, спарен с самым 5'-концом 5,8S РНК.

Замыкание 3'-конца 23S РНК на ее 5'-конец должно отражать, скорее всего, некую общую компактную свернутость всей молекулы и фиксировать эту свернутость. Электронно-микроскопическое изучение изолированной 23S РНК *E. coli* в ионных условиях, обеспечивающих ее компактность, действительно обнаружило, что ее форма резко отличается от таковой 16S РНК (где нет спаривания 5'-конца с 3'-концом) в тех же условиях: молекула 23S РНК оказывается гораздо более округлой, имея лишь незначительные выступы (рис. 51). И опять поразительный факт: контуры изолированной 23S РНК напоминают контуры исходной 50S субчастицы, лишь с сильно редуцированными протуберанцами (рис. 52). Хочется еще раз повторить, что, по-видимому, цепь рибосомной РНК самоукладывается специфически, и что общая морфология рибосомной субчастицы детерминирована прежде всего ее РНК.

Рекомендуемая литература

Итоги науки и техники. — М.: ВИНТИ. Сер. биол. химия, 1981. Т. 15. С. 38–115; 175–233.

Молекулы и клетки: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: Мир, 1967. С. 22–36.

Нуклеиновые кислоты: Пер. с англ./Под ред. А. Н. Белозерского. М.: Мир, 1965. С. 341–388.

Спирин А. С. Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот. М.: Изд-во АН СССР, 1963.

Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М.: Наука, 1971.

Богданов А. А. О роли РНК в организации структуры рибосом *E. coli*. — Молекул. биол., 1978. Т. 12. С. 725–735.

Манькин А. С., Копылов А. М., Рубцов П. М., Скрябин К. Г. Модель вторичной

- структуры 18S рРНК рибосом зукариот. — Докл. АН СССР, 1981. Т. 256. С. 1006—1010.
- Bosch L., ed.* The Mechanism of Protein Synthesis and Its Regulation. Amsterdam-London: North-Holland, 1972, p. 353—394.
- Chambliss G. et al., eds.* Ribosomes: Structure, Function, and Genetics. Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 3—49; 333—355.
- Cohn W. E., ed.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1976, v. 18, p. 1—90; 1983, v. 28, p. 1—48; 177—209.
- Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds.* Ribosomes. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 141—191; 829—839.
- Erdmann V. A.* Collection of published 5S and 5.8S RNA sequences and their precursors. — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. r25—r42.
- Fox G. E., Woese C. R.* 5S RNA secondary structure. — Nature, 1975, v. 256, p. 505—507.
- Georgiev O. I., Nikolaev N., Hajilov A. A. et al.* The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete sequence of the 25S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 6953—6958.
- Hori H.* Molecular evolution of 5S RNA. — Molec. Gen. Genet., 1976, v. 145, p. 119—123.
- Loening U. E.* Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution. — J. Mol. Biol., 1968, v. 38, p. 355—365.
- Mankin A. S., Kopylov A. M.* A secondary structure model for mitochondrial 12S RNA: an example of economy in rRNA structure. — Biochem. Int., 1981, v. 3, p. 587—593.
- Nishikawa K., Takemura S.* Nucleotide sequence of 5S RNA from *Torulopsis utilis*. — FEBS Lett., 1974, v. 40, p. 106—109.
- Serdyuk I. N., Agalarov S. Ch., Sedelnikova S. E. et al.* On the shape and compactness of the isolated ribosomal 16S RNA and its complexes with ribosomal proteins. — J. Mol. Biol., 1983, v. 169, p. 409—425.
- Stiegler P., Carbon P., Ebel J.-P., Ehresmann C. A.* general secondary-structure model for procaryotic and eucaryotic RNAs of the small ribosomal subunits. — Eur. J. Biochem., 1981, v. 120, p. 487—495.
- Veldman G. M., Klootwijk J., de Regt V. C. H. F. et al.* The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 6935—6952.
- Walker T. A., Pace N. R.* 5.8S ribosomal RNA. — Cell, 1983, v. 33, p. 320—322.
- Żwieb C., Glotz C., Brimacombe R.* Secondary structure comparisons between small subunit ribosomal RNA molecules from six different species. — Nucleic Acids Res., 1981, v. 9, p. 3621—3640.

Глава III

РИБОСОМНЫЕ БЕЛКИ

1. РАЗНООБРАЗИЕ. НОМЕНКЛАТУРА

Каждая рибосомная субчастица содержит много различных белков, и большинство из них представлено лишь одной молекулой на рибосому. В этом состоит коренное отличие структурно асимметричного рибосомного рибонуклеопротеида от вирусных нуклеопротеидов, образованных за счет упорядоченной упаковки многих идентичных белковых субъединиц. Открытие и доказательство этого факта, главным образом в пионерских исследованиях Ж.-П. Валлера, установило один из важнейших принципов структурной организации рибосом.

Лучшим способом аналитического разделения рибосомных белков является электрофорез в геле. Уже при одномерном гель-электрофорезе в денатурирующих условиях можно получить значительное фракционирование рибосомных белков по заряду и молекулярной массе (размеру). Среди рибосомных белков большинства живых организмов преобладают умеренно основные полипептиды, хотя всегда

имеется и несколько нейтральных и кислых белков. Молекулярные массы рибосомных белков варьируют в основном от 10000 до 30000 дальтон, и лишь единичные белки достигают массы около 60000—70000 дальтон. В прокариотических рибосомах малая (30S) субчастица содержит около 20, а большая (50S)—около 30 различных белков. В эукариотических рибосомах белков больше: малая (40S) субчастица имеет около 30 белков, а большая (60S)—около 40. Как уже отмечалось, почти все (но не все!) белки содержатся лишь по одной молекуле на рибосому.

Полное аналитическое разрешение всех рибосомных белков достигается с помощью двумерного гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Удобная система разделения была предложена Э. Кальтшмидтом и Г. Виттманном: они использовали 8%-ный полиакриламидный гель при pH 8,6 для электрофореза в первом направлении и 18%-ный гель при pH 4,6 во втором направлении. В этих условиях разделялись все белки 30S субчастицы и все белки 50S субчастицы *E. coli*. Пример такого разделения белков обеих рибосомных частиц в слегка модифицированной системе дан на рис. 53 и 54. Первое направление электрофореза в рыхлом геле при нейтральном или слегка щелочном pH обеспечивает движение кислых и нейтральных белков влево, к аноду, в то время как основные белки мигрируют вправо, к катоду, разделяясь в основном по заряду. Второе направление электрофореза в плотно сшитом геле при кислом pH обеспечивает движение всех белков в одну сторону—к катоду (вниз), и в их разделение большой вклад вносит размер разделяемых компонентов (чем меньше, тем подвижнее).

Разделение в вышеуказанной системе легко в основу современной номенклатуры рибосомных белков. Было предложено обозначать рибосомные белки цифрами по порядку сверху вниз, как это видно на двумерных электрофореграммах (рис. 53 и 54). Белки малой (small) рибосомной субчастицы (30S или 40S) отмечаются индексом S (S1, S2, S3, и т. д.), а белки большой (large) рибосомной субчастицы (50S или 60S)—соответственно, индексом L (L1, L2, L3, и т. д.). Малая субчастица рибосомы *E. coli* содержит 21 белок, от S1 до S21. Большая субчастица рибосомы содержит 32 различных белка, от L1 до L34; пятно, обозначенное первоначально как L8, не представляет собой отдельного белка, а является комплексом белков L10 и L12; пятна, обозначенные как L7 и L12, оказались одним и тем же белком, и L7 является лишь N-ацетилованным производным L12. Белок S20 в малой субчастице оказался идентичным белку L26 в большой субчастице. Таким образом, 70S рибосома *E. coli* содержит 52 различных белка.

Кислый белок L7 / L12 рибосом *E. coli* (120 аминокислотных остатков, молекулярная масса 12200 дальтон) является уникальным в том отношении, что представлен четырьмя молекулами на рибосому; он, по-видимому, образует тетрамер с молекулярной массой около 50000 дальтон. Аналоги этого кислого белка имеются в рибосомах всех организмов, включая как прокариоты, так и эукариоты.

Кроме белков S20 / L26 и L7 / L12, все остальные белки имеются

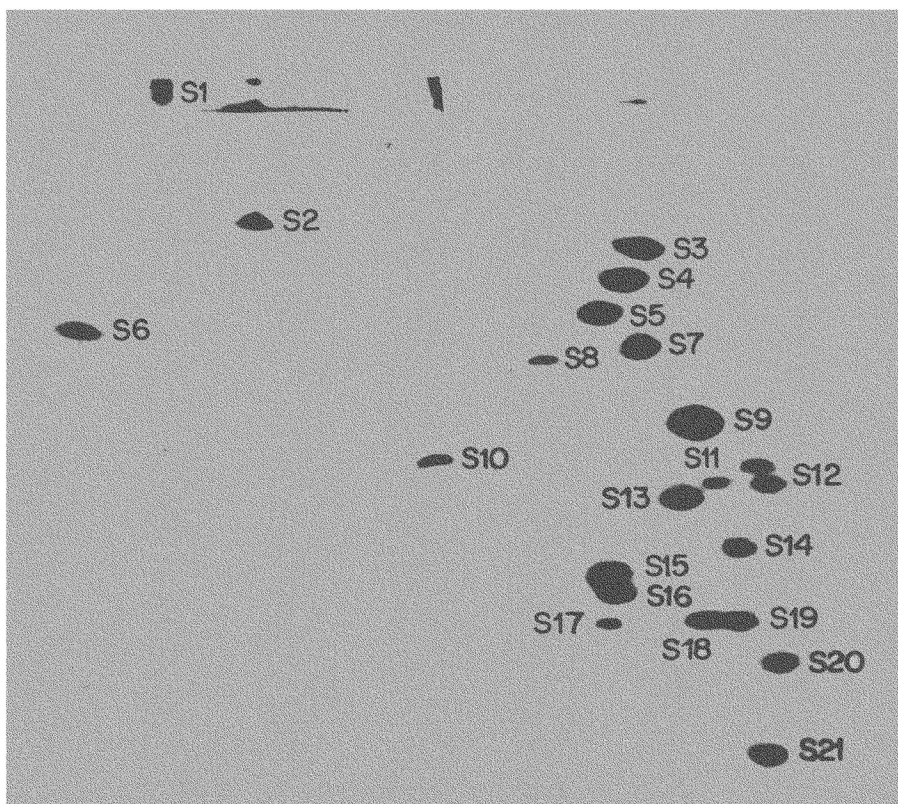


Рис. 53. Двумерное электрофоретическое разделение белков рибосомной 30S субчастицы *E. coli* и их номенклатура (по E. Kaltschmidt, H. C. Wittmann Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1970, v. 67, p. 1276–1282):

первое направление (горизонтальное): 4%-ный полиакриламидный гель, содержащий 8 М мочевины, pH 8,6; второе направление (вертикальное, сверху вниз): 18%-ный полиакриламидный гель, содержащий 6 М мочевины, pH 4,6

в рибосоме *E. coli* только в одном экземпляре. Наиболее крупный белок содержится в малой субчастице; это S1 (557 аминокислотных остатков, молекулярная масса 61160 дальтон); он довольно лабильно связан с рибосомой и легко теряется при выделении. Остальные белки много меньше по размеру; молекулярная масса самых крупных из них (S2, S3) — около 26000 дальтон. Самые маленькие белки — L29, L30, L31, L32, L33 и L34 — представляют собой основные полипептиды с длиной около 50–60 аминокислотных остатков (молекулярная масса около 5000–7000 дальтон), и все сосредоточены в большой рибосомной субчастице. Размеры рибосомных белков *E. coli* представлены в табл. 1.

В эукариотических рибосомах имеются белки с молекулярными массами между 26000 и 60000 дальтон, в дополнение к более мелким белкам (см. Bielka, 1982).

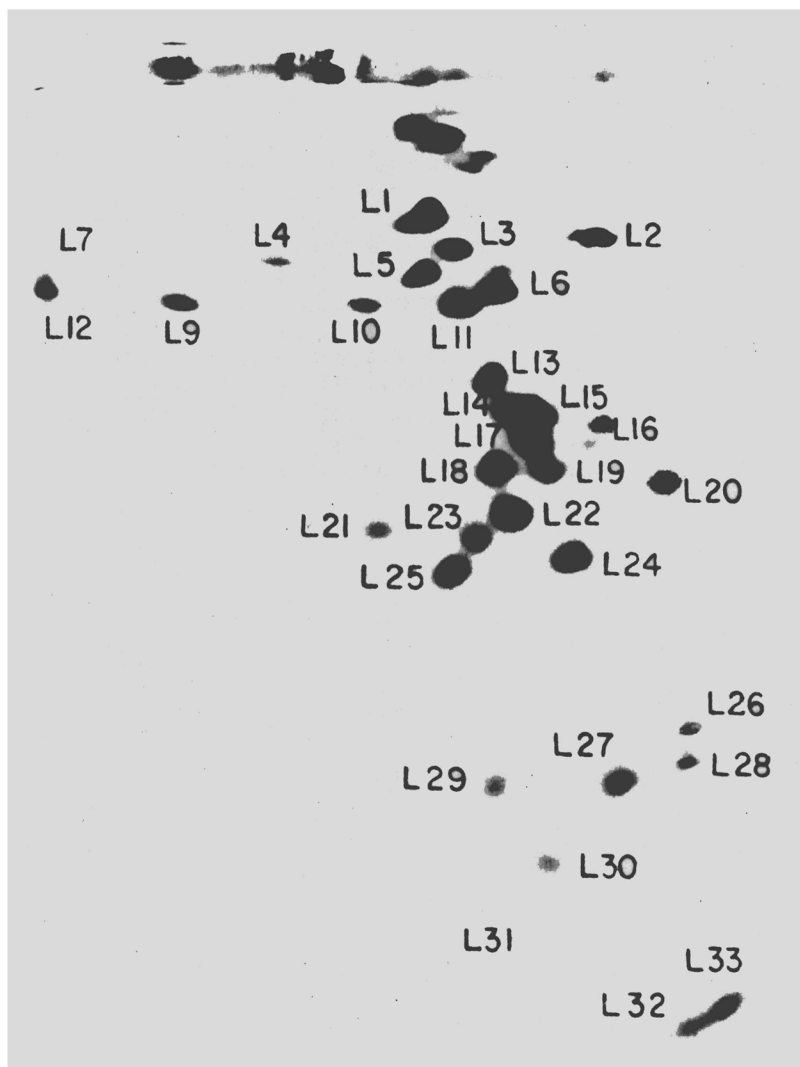


Рис. 54. Двумерное электрофоретическое разделение белков рибосомной 50S субчастицы *E. coli* и их номенклатура по E. Kaltshmidt, H. G. Wittmann Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1970, v. 67, p. 1276–1282):

пятно L 34 на этой электрофорограмме не видно/Условия разделения те же, что на рис. 53/

Таблица 1. Размеры рибосомных белков *Escherichia coli*

Обозначение белка	Количество аминокислотных остатков	Молекулярная масса, дальтон	Радиус инерции, Å (1Å = 0,1 нм)		Обозначение белка	Количество аминокислотных остатков	Молекулярная масса, дальтон	Радиус инерции, Å (1Å = 0,1 нм)
S1	557	61159	58, 63*(?)		L5	178	20171	
S2	240	26613			L6	176	18832	
S3	232	25852	16*		L7 / L12	120	12206	
S4	203	23138	18, 31*		L9	148	15696	
S5	166	17514	14*		L10	165	17736	
S6	131	15187	14*		L11	141	14872	
S7	177	19732	15, 14*		L13	142	16019	
S8	129	13996	13, 13*		L14	120	13227	
S9	128	14569	13*		L15	144	14981	
S10	103	11736	12*		L16	136	15295	
S11	128	13728	13*		L17	127	14365	
S12	123	13608	13*		L18	117	12770	
S13	117	12968			L19	114	13002	
S14	98	11191			L20	117	13366	
S15	87	10001	13, 12*		L21	103	11564	
S16	82	9192	12		L22	110	12226	
S17	83	9573			L23	99	11013	13*
S18	74	8896			L24	103	11185	
S19	91	10299			L25	94	10694	
S20-L26	86	9553			L27	84	8993	
S21	70	8369			L28	77	8875	
					L29	63	7272	
					L30	58	6411	
L1	233	24599	26*		L31	62	6971	
L2	272	29730			L32	56	6315	
L3	209	22258	22*		L33	54	6255	
L4	201	22087	20*		L34	46	5380	

* Величины без звездочки — минимальные значения, полученные для изолированных белков в компактной конформации (I. N. Serdyuk et al. FEBS Lett., 1978, v. 94, p. 349–352). Звездочкой отмечены радиусы инерции, полученные для белков *in situ* (без их выделения) с помощью техники нейтронного рассеяния (V. R. Ramakrishnan et al. J. Mol. Biol., 1981, v. 153, p. 739–760; K. H. Nierhaus et al. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1983, v. 80, p. 2889–2893).

2. ПЕРВИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ

В настоящее время определены первичные структуры всех рибосомных белков *E. coli*. Подавляющее большинство первичных структур было установлено группой Б. Виттманн-Либольд в отделе Г. Виттманна (Зап. Берлин). Сравнение этих первичных структур показало их полную неперекрываемость; каждый рибосомный белок действительно оказался уникальным по своей аминокислотной последовательности, и никаких гомологий между белками заметить не удалось. Таким образом, в рибосоме *E. coli* имеется 52 различные аминокислотные последовательности.

Каких-либо принципиальных особенностей первичных структур рибосомных белков по сравнению с обычными растворимыми глобулярными белками отмечено не было. Большинство последователь-

ностей, однако, содержит повышенное количество лизиновых и аргининовых остатков, иногда в виде лизин-аргининбогатых блоков, что прямо связано, по-видимому, с РНК-связывающими свойствами рибосомных белков и обуславливает их суммарный положительный заряд (основной характер). Во многих белках отсутствует триптофан.

Первичные структуры рибосомных белков сильно консервативны в эволюционном отношении. Во всяком случае, между эквивалентными рибосомными белками представителей двух различных групп эубактерий — граммотрицательных бактерий (*Escherichia*) и грамположительных бактерий (*Bacillus*) — наблюдается большая гомология аминокислотной последовательности; как правило, не менее 50% аминокислотных остатков в полипептидной цепи соответствующего белка совпадают. Точно так же значительная гомология аминокислотной последовательности прослеживается между белками рибосом различных эволюционно удаленных эукариотических организмов; животные, высшие растения и грибы могут обнаруживать гомологию их эквивалентных рибосомных белков до 40—50%. Интересно, что архебактерии (метабактерии) тоже имеют некоторую гомологию их рибосомных белков с эквивалентными белками эукариот (до 20—30%), но мало гомологии, или совсем никакой, с рибосомными белками эубактерий.

3. ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ СТРУКТУРЫ

Рибосомные белки характеризуются в основном глобулярной компактной конформацией, с развитой вторичной и третичной структурой. Одно время широко распространилось убеждение, что рибосомные белки являются особенными, не похожими на обычные глобулярные белки; сообщалось об их сильно вытянутой или сильно рыхлой конформации, иногда разветвленной по всей рибосомной субчастице. Однако скоро стало понятно, что рыхлые конформации изолированных рибосомных белков представляют собой артефакт, являющийся следствием низкой стабильности их нативной конформации вне рибосомы. Конформация рибосомных белков стабилизируется при взаимодействии с РНК и друг с другом. Тем не менее, при соблюдении определенных условий большинство рибосомных белков можно выделить в индивидуальном виде в компактной конформации, по-видимому, близкой к нативной. Оказалось возможным также продемонстрировать компактность ряда рибосомных белков *in situ*, в составе рибосомной частицы.

Таким образом, рибосомные белки не отличаются принципиально от обычных растворимых глобулярных белков по своей компактности и общей степени свернутости полипептидной цепи во вторичные и третичные структуры. Компактность некоторых рибосомных белков в сравнении с рядом обычных растворимых глобулярных белков, в терминах их радиусов инерции, демонстрируется на рис. 55. На рис. 56, а спектр кругового дихроизма одного из рибосомных белков *E. coli* — S15 —, показывающий высокую долю вторичной структуры (α -спиралей) в нем. На рис. 56, б дан спектр ядерного протонного магнитного резонанса этого же белка, из которого видно суще-

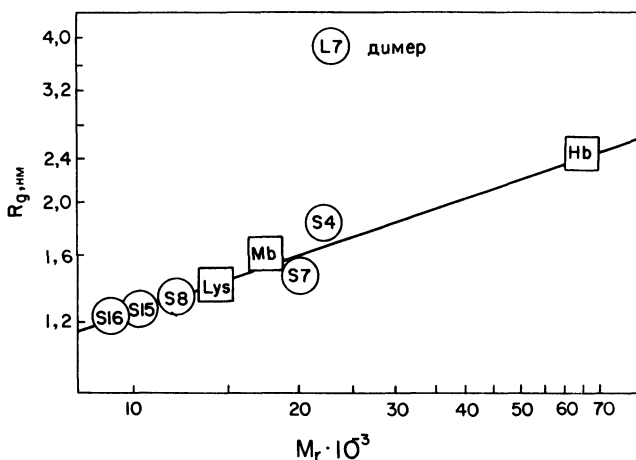


Рис. 55. Зависимость радиусов инерции некоторых рибосомных белков *E. coli* от их молекулярной массы (по I. N. Serdyuk et. al. FEBS Lett., 1978, v. 94, p. 349–352; J. Mol. Biol., 1980, v. 137, p. 93–107).

Для сравнения также даны радиусы инерции против молекулярной массы для некоторых типичных глобулярных белков — лизоцима (Lys), миоглобина (Mb) и гемоглобина (Hb). Наклон прямой этой зависимости составляет $1/3$, что характерно для гомологичного ряда белков глобулярной компактной формы. (Глобулярная компактная конформация белков вовсе не означает их сферической формы и допускает определенные вариации аксиального отношения эквивалентного эллипсоида вращения)

ствование специфического окружения остатков ароматических аминокислот, гистидиновых остатков и метильных групп белка, указывающего на его развитую третичную структуру.

Вместе с тем, по крайней мере некоторые рибосомные белки могут иметь некомпактные «хвосты». Например, белок S6 *E. coli* характеризуется наличием сильно кислой С-концевой последовательности, кончающейся несколькими глутаминовыми остатками подряд, которая вряд ли включена в глобулярную часть белка. Белок S7 является типичным компактным глобулярным белком, но в штамме *E. coli* К он имеет дополнительную последовательность на С-конце, которая, по-видимому, не является необходимой частью его глобулярной структуры.

Рядом особенностей отличается кислый белок L7 / L12. Уже указывалось, что в рибосоме он образует тетрамер. В растворе стабильной является его димерная форма. Димер белка L7 / L12 — это жесткая вытянутая палочкообразная молекула с радиусом инерции около 4 нм (длина около 10 нм при молекулярной массе 25000 дальтон). В тетрамере они уложены, по-видимому, параллельно, формируя палочкообразный стержень 50S субчастицы (см. гл. Б.И). Мономерная субъединица белка L7 / L12 оказалась построенной из двух доменов — глобулярного С-концевого (около 70–80 аминокислотных остатков) и неглобулярного (вытянутого) N-концевого (приблизительно 40 аминокислотных остатков).

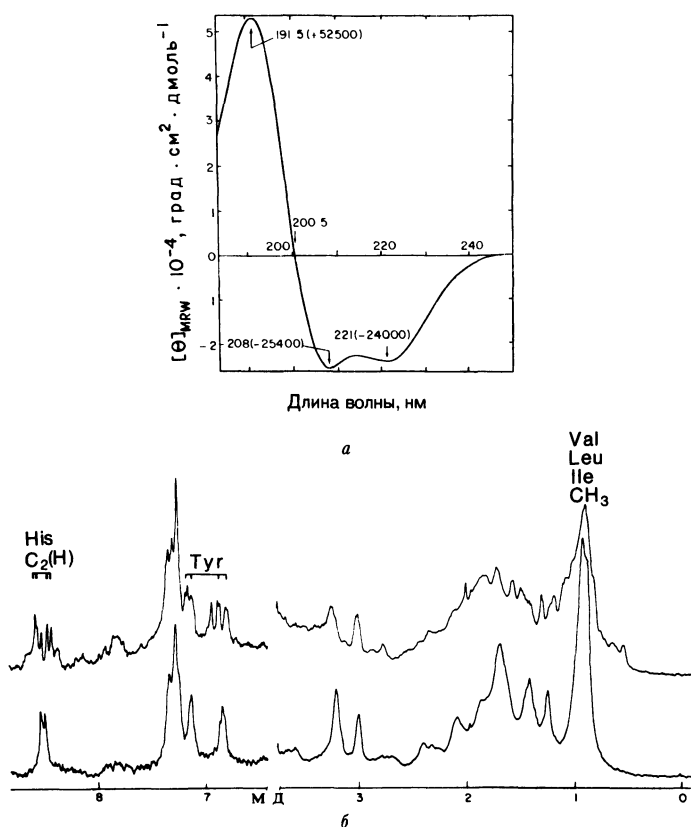


Рис. 56. Спектры циркулярного дихроизма и протонного ядерного магнитного резонанса рибосомного белка S15, демонстрирующие существование вторичной и третичной структуры (по Z. V. Gogia et al. FEBS Lett., 1979, v. 105, p. 63–69):

а — Спектр циркулярного дихроизма. Рассчитанное из спектра содержание α -спиральной конформации составляет не менее 70%, б — Спектр протонного ЯМР белка S15 в компактной форме (вверху), в сравнении со спектром того же белка в денатурирующих условиях — 5М мочеvine (внизу). В случае компактного белка видны резонансные линии от взаимодействия алифатических аминокислотных остатков с ароматическими остатками в крайне высокопольной области спектра (0,1–0,8 м. д.), широкие перекрывающиеся линии неполярных алифатических остатков в умеренно высокопольной области (0,8–3,5 м. д.) и сдвиги сигналов ароматических остатков в низкопольной области (6,5–8,5 м. д.), характеризующие третичную структуру белка

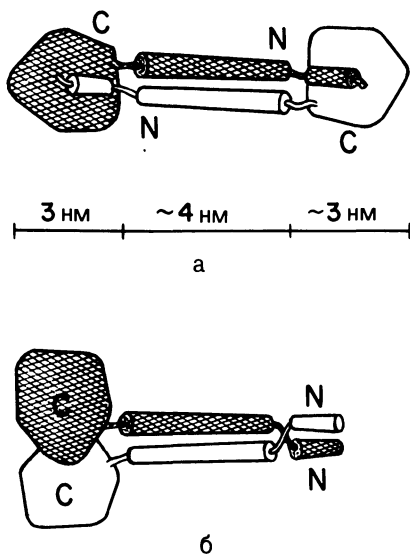


Рис. 57. Схема димеризации рибосомного белка L7/L12: два возможных варианта (по А. Т. Gudkov et al. FEBS Lett., 1977, v. 82, p. 125–129; С. А. Luer, К. – Р. Wong Biochemistry, 1979, v. 18, p. 2019–2027; А. Liljas. Prog. Biophys. Molec. Biol., 1982, v. 40, p. 161–228):

а – антипараллельная укладка; б – параллельная укладка; N и С – палочкообразные N-концевые и глобулярные С-концевые домены, соответственно

кислотных остатков), соединенных легко расщепляемым «шарниром». Похоже, что две N-концевые аланин-богатые последовательности образуют жесткий биспиральный комплекс (две параллельные α -спирали), и две такие пары формируют в рибосоме основную часть палочкообразного стержня 50S субчастицы. Согласно одной модели, спирали в димере антипараллельны (рис. 57, а), и тогда в тетрамере два глобулярных домена образуют проксимальную часть L7/L12 стержня, а два других – дистальную (гантелеобразная структура). По другой модели субъединицы белка L7/L12 уложены параллельно (рис. 57, б), так что в тетрамере четыре глобулы образуют или основание, или конец L7/L12 стержня.

Глобулярный домен белка L7/L12 *E. coli* (фрагмент 47–120) – первый белковый элемент рибосомы, который был закристаллизован и пространственная структура которого была установлена рентгенографическим методом с разрешением 0,17 нм. Вторичная структура глобулы включает α -спирали и

β -структуру; их последовательное расположение вдоль полипептидной цепи – $\beta\alpha\alpha\beta$. В пространстве они образуют два слоя: три α -спирали уложены в один слой, и антипараллельная β -структура из трех тяжей образует другой слой. Схематически пространственная структура глобулярного домена белка L7/L12 дана на рис. 58.

4. БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Одним из сравнительно мягких способов диссоциации рибосомных белков от рибосомной частицы служит обработка высокими концентрациями одновалентных солей, таких как CsCl, LiCl, NH₄Cl. Замечено, что многие белки диссоциируют при этом не как индивидуальные молекулы, а группами. Это отражает определенную кооперативность удержания белков в составе рибосомной частицы. В некоторых случаях группы белков представляют собой белковые комплексы, целиком удаляемые из частицы раствором соли высокой концентрации. Одним из таких стабильных комплексов является пентамер, образуемый одной молекулой белка L10 и тетрамером белка L7/L12.

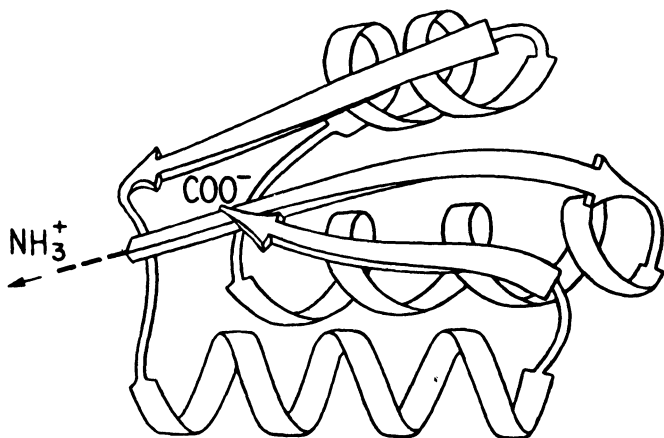


Рис. 58. Схема пространственной структуры глобулярного С-концевого домена рибосомного белка L7/L12: ленточное изображение хода полипептидной цепи (по A. Liljas, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 1982, v. 40, p. 161–228; M. Leijonmarck et al. *Nature*, 1980, v. 286, p. 824–826)

Он избирательно удаляется из 50S субчастицы обработкой смесью 1 M NH_4Cl с этанолом. Соответственно, такое удаление лишает 50S субчастицу ее стержня. В комплексе как белок L10, так и белок L7/L12 обладают существенно большей стабильностью их глобулярных структур, чем в индивидуальном состоянии. Пентамерный комплекс может быть в лабильной ассоциации с еще одним белком — L11.

Другой пример комплекса — пара белков S6–S18. Интересно, что по отдельности эти белки, и особенно S18, крайне нестабильны; S18 вообще трудно получить в компактной конформации в изолированном состоянии при обычных условиях. Однако, образуя комплекс, белки стабилизируют конформацию друг друга. Комплекс представляет собой компактную структуру глобулярного типа.

Белок-белковые комплексы могут играть очень важную роль в структуре и функции рибосомы, участвуя в формировании четвертичных структур ее функциональных центров.

5. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РИБОСОМНЫМИ РНК

Четвертичные структуры функциональных центров рибосомы формируются также и с участием рибосомных РНК.

Низкомолекулярная рибосомная РНК — 5S РНК — взаимодействует с рядом белков 50S субчастицы, образуя с ними комплекс, локализующийся в районе центрального протуберанца (см. предыдущую главу). Три белка — L5, L18 и L25 — образуют довольно прочный нуклеопротеидный комплекс с 5S РНК. С этим комплексом более лабильно взаимодействуют также белки L2, L3, L15, L16, L17, L21, L22, L33 и L34. Этот большой комплекс уже проявляет некоторые

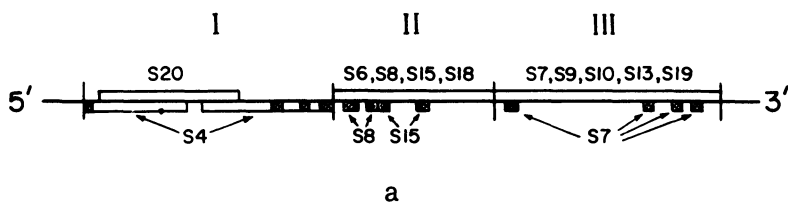
функциональные свойства: он может связывать тРНК и имеет определенное сродство к 30S субчастице.

Аналогична ситуация и в случае эукариотических рибосом. 5S РНК печени крысы образует комплекс с белками L5, L6 и L18 рибосомной 60S субчастицы; белки L7, L8 и L35 более лабильно связаны в комплексе. Эукариотическая 5,8S РНК, представляющая собой структурный гомолог 5'-концевой последовательности прокариотической 23S РНК, вступает в комплекс почти с тем же набором белков: L5, L6, L7 и L18. В результате может быть образован единый комплекс, содержащий 5S РНК, 5,8S РНК и белки L5, L6, L18 и др. Этот эукариотический комплекс обладает функциональной активностью: он может связывать тРНК.

Особый интерес представляют, конечно, взаимодействия рибосомных белков с высокополимерными рибосомными РНК (16S и 23S РНК прокариот или 18S и 28S РНК эукариот), ибо они представляют собой основной ковалентный каркас и структурное ядро рибосомных субчастиц. По-видимому, большинство рибосомных белков контактируют и так или иначе взаимодействуют с высокополимерными рибосомными РНК. Однако среди них можно выделить специальные «сердцевинные» РНК-связывающие белки, которые прочно взаимодействуют с соответствующей рибосомной РНК, более или менее независимо от других белков. Такими белками малой (30S) рибосомной субчастицы *E. coli*, независимо вступающими в комплекс с 16S РНК, являются S4, S7, S8, S15, S17 и S20. Каждый из них связывается только со специфическим местом на 16S РНК, узнавая его нуклеотидную последовательность и пространственную структуру. Эту последовательность можно выявить таким путем: изолированный белок добавляется к рибосомной РНК, в результате чего образуется специфический белок-РНК-комплекс; комплекс переваривается рибонуклеазой, так что негидролизованной остается лишь та часть нуклеотидной последовательности, которая закрыта белком; эта защищенная последовательность определяется и, таким образом, идентифицируется. Другой метод локализации белков на первичной структуре рибосомной РНК — ковалентная сшивка (например, фотоиндуцированная) белка с РНК непосредственно в составе рибосомы, с последующим удалением несшитых белков, перевариванием РНК с помощью РНКазы и идентификацией сшитого олигонуклеотида. Расположение мест связывания вышеуказанных шести белков вдоль цепи 16S РНК схематически показано на рис. 59, а. Видно, что белки S4 и S20 (а также S17, не показанный на рисунке) комплексируются в районе 5'-концевой трети 16S РНК (домен I), белки S8 и S15 взаимодействуют с серединой 16S РНК (домен II), а белок S7 имеет место посадки в районе 3'-концевой трети цепи этой РНК (домен III).

Можно указать районы вторичной структуры 16S РНК, узнаваемые независимо связывающимися белками. Белок S8 узнает, связывает и защищает от нуклеаз длинную составную спираль 25—26 в домене II (см. рис. 42). Белок S15 занимает непосредственно соседнюю, по направлению к 3'-концу РНК, длинную составную спираль 28—29—30. Белок S4 узнает и связывает шпильку, включающую спирали 20

16S РНК



23S РНК

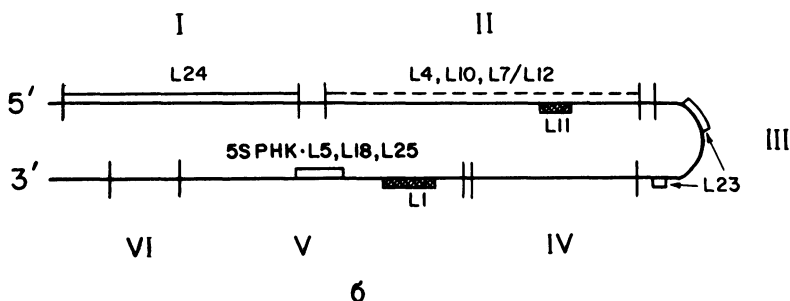


Рис. 59. Схема расположения мест связывания «сердцевинных» рибосомных белков вдоль цепей рибосомных 16S РНК (а) и 23S РНК (б) (по S. Mizushima, M. Nomura, Nature, 1970, v. 226, p. 1214–1218; R. A. Zimmermann, in: Ribosomes, N.-Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 225–269; R. A. Zimmermann, In: Ribosomes: Structure, Function, and Genetics, Baltimore: University Park Press, 1980, p. 135–169):

римскими цифрами обозначены отрезки РНК, образующие соответствующие структурные домены

и 21, и, по-видимому, основания двух непосредственно смежных спиралей 2 и 18 (одна из которых — черешок домена I); стабилизируя компактную структуру всего домена I, белок S4 защищает от нуклеаз гораздо более протяженные районы цепи. Белок S7 узнает и связывает район домена III, куда сходятся несколько спиралей — 39, 40, 52 и 54–55.

Белками, независимо и специфически связывающимися с определенными участками рибосомной 23S РНК *E. coli*, являются L1, L2, L3, L4, L6, L9, L11, L20, L23, L24 и некоторые другие, а также пентамерный комплекс $(L7/L12)_4 \cdot L10$. Схема расположения мест связывания некоторых белков вдоль цепи 23S РНК дана на рис. 59, б.

Другие рибосомные белки, взаимодействующие с рибосомной РНК, требуют для образования достаточно прочных комплексов с ней также и присутствия хотя бы одного или нескольких «сердцевинных» РНК-связывающих белков. Здесь возможны два случая: либо соб-

16S РНК

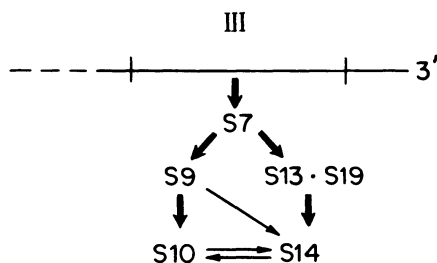


Рис. 60. Группа взаимозависимых рибосомных белков, удерживаемая в районе 3'-проксимального домена (III) 16S РНК (по S. Mizushima, M. Nomura, Nature, 1970, v. 226 p. 1214–1218):

стрелки указывают направление, в котором один компонент (РНК или белок) оказывает стимулирующее действие на связывание другого компонента (белка); жирными стрелками обозначены сильно выраженные эффекты, тонкими — менее выраженные

необходимы белки L3 и L4; в свою очередь, удержание L15 закрепляет посадку на 23S РНК белков L6, L11, L16, L18 и обеспечивает присоединение белков L25 и L27 (рис. 61).

Не исключено, что некоторые рибосомные белки могут не иметь собственного сродства к рибосомной РНК и удерживаться только за счет белок-белковых взаимодействий.

Таким образом, как в пределах малой (30S), так и большой (50S)

23S РНК

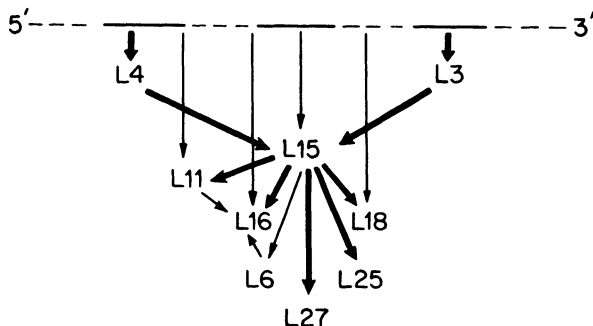


Рис. 61. Взаимозависимость удержания некоторых рибосомных белков на 23S РНК (по K. H. Nierhaus, in: Ribosomes: Structure, Function, and Genetics, Baltimore: University Park Press, 1980, p. 267–294):

стрелки означают то же, что и на рис. 60

собственного взаимодействия белка с РНК недостаточно для образования прочного комплексы, и оно должно быть подкреплено белок-белковым взаимодействием с предварительно связавшимся белком, либо предварительно связавшийся белок наводит (стабилизирует) локальную конформацию РНК, требуемую для связывания данного белка. Так, в 30S субчастице *E. coli* посадка белка S7 способствует закреплению белков S9, S13 и S19, а также S10 и S14 в районе 3'-концевой трети 16S РНК (домен III); возможно, что S9 и S13–S19 непосредственно взаимодействуют с S7, тогда как влияние S7 на удержание S10 и S14 является более опосредованным (рис. 60). В 50S субчастице *E. coli* белок L15 имеет собственное сродство к 23S РНК, но для его прочного удержания необ-

рибосомных субчастиц можно выявить определенные кооперативные группы белков, привязанные к тем или иным местам пространственной структуры рибосомной РНК. В 30S субчастице *E. coli* одну такую группу образуют белки 3'-проксимального домена 16S РНК (домен III): S7, S9, S13, S19, S10, S14 (рис. 60), а также S3 и S2. Все они, как будет показано в следующей главе, располагаются на «головке» 30S субчастицы и формируют ее тРНК-связывающий центр. Другая кооперативная группа белков 30S субчастицы привязана к серединному домену 16S РНК (домен II) и включает РНК-связывающие белки S8 и S15, пару S6–S18, а также S11 и S21; это в основном белки боковой лопасти («платформы») 30S субчастицы. Эта группа через белки S5 и S12 тесно связана с кооперативной группой 5'-концевого домена 16S РНК (домен I), куда относятся РНК-связывающие белки S4, S17 и S20, а также белки S12 и S16, входящие в состав центрального «тела» субчастицы.

Рекомендуемая литература

- Bielka H., ed.* The Eukaryotic Ribosome. Berlin: Akademie-Verlag, 1982.
- Chambliss G. et al., eds.* Ribosome: Structure, Function, and Genetics. Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 51–88; 333–355; 797–824.
- Cohn W. E., ed.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. N. Y.: Acad. Press, 1976, v. 18, p. 1–44; 1983, v. 28, p. 1–48; 101–142.
- Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds.* Ribosomes. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 93–140; 193–223; 309–331; 417–460.
- Weissbach H., Pestka S., eds.* Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis. N. Y.: Acad. Press, 1977, p. 117–202.
- Horne J. R., Erdmann V. A.* Isolation and characterization of 5S RNA-protein complexes from *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli* ribosomes. – Mol. Gen. Genet., 1972, v. 119, p. 337–344.
- Kaltschmidt E., Wittmann H. G.* Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. – Anal. Biochem., 1970, v. 36, p. 401–412.
- Liljas A.* Structural studies of ribosomes. – Prog. Biophys. Mol. Biol., 1982, v. 40, p. 161–228.
- Metspalu E., Ustav M., Maimets T., Villems R.* The composition and properties of the *Escherichia coli* 5S RNA-protein complex. – Eur. J. Biochem., 1982, v. 121, p. 383–389.
- Nierhaus K. H., Lietzke R., May R. P. et al.* Shape determinations of ribosomal proteins *in situ*. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1983, v. 80, p. 2889–2893.
- Ramakrishnan V. R., Yabuki S., Sillers I.-Y. et al.* Positions of proteins S6, S11 and S15 in the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. – J. Mol. Biol., 1981, v. 153, p. 739–760.
- Serdyuk I. N., Zaccai G., Spirin A. S.* Globular conformation of some ribosomal proteins in solution. – FEBS Lett., 1978, v. 94, p. 349–352.
- Terhorst C. P., Möller W., Laursen R., Wittmann-Liebold B.* The primary structure of an acidic protein from 50S ribosomes of *Escherichia coli* which is involved in GTP hydrolysis dependent on elongation factors G and T. – Eur. J. Biochem., 1973, v. 34, p. 138–152.
- Waller J.-P.* Fractionation of the ribosomal protein from *Escherichia coli*. – J. Mol. Biol., 1964, v. 10, p. 319–336.
- Waller J.-P., Harris J. I.* Studies on the composition of the proteins from *Escherichia coli* ribosomes. – Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1961, v. 47, p. 18–23.
- Wittmann H. G.* Components of bacterial ribosomes. – Ann. Rev. Biochem., 1982, v. 51, p. 155–183.

Глава IV

ВЗАИМОРАСПОЛОЖЕНИЕ РИБОСОМНОЙ РНК И БЕЛКОВ (ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА)

1. ПЕРИФЕРИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ БЕЛКОВ НА ЯДРЕ РНК

В отличие от вирусных нуклеопротеидов, в рибосоме РНК не покрыта сплошной белковой оболочкой. Давно было показано, что значительные участки рибосомной РНК в рибосоме экспонированы и вполне доступны для действия внешних агентов — например, нуклеаз. Это принципиальное отличие от вирусных частиц понятно, поскольку рибосома представляет собой рабочую функционирующую структуру, где РНК должна активно участвовать во взаимодействиях с внешними факторами, а не быть хранилищем генетической информации, требующим защиты.

В то же время, белок и РНК в рибосоме вовсе не взаимоперемешаны. Высокополимерная РНК каждой рибосомной субчастицы самосвернута в компактную структуру той или другой формы (см. раздел II), и белки внутрь нее, по-видимому, не попадают. Следовательно, рибосомные белки должны располагаться преимущественно на компактно свернутой высокополимерной РНК. Это значит, что белки занимают преимущественно периферическое положение на ядре РНК.

Впервые этот принцип организации рибосомы был выведен И. Н. Сердюком и др. из экспериментов по измерению радиусов инерции (R_g) рибосомных субчастиц. Прежде всего, радиус инерции, измеренный методом диффузного малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, оказался существенно меньше, чем можно было ожидать из размеров (объема) субчастицы, если бы она была однородно плотным телом. Отсюда следовал вывод, что электронно более плотный компонент частицы (РНК) локализуется преимущественно ближе к центру тяжести частицы, в то время как менее плотный компонент (белок) имеет тенденцию располагаться в среднем ближе к периферии. Далее, измерение радиусов инерции рибосомных субчастиц с помощью разных типов излучения (рентгеновские лучи, нейтроны, свет) показало, что чем больше вклад белкового компонента, по сравнению с РНК, в рассеяние (относительная рассеивающая доля белка растет в вышеуказанном ряду типов излучения), тем больше значение радиуса инерции частицы (рис. 62). Наконец, применение нейтронного рассеяния частиц в растворителях с разной рассеивающей способностью для нейтронов (разным соотношением H_2O и D_2O) позволило прямо измерить радиус инерции РНК и белкового компонента *in situ* в отдельности. Дело в том, что H_2O и D_2O сильно различаются по рассеивающей способности для нейтронов, а рассеивающие способности биологических макромолекул занимают проме-

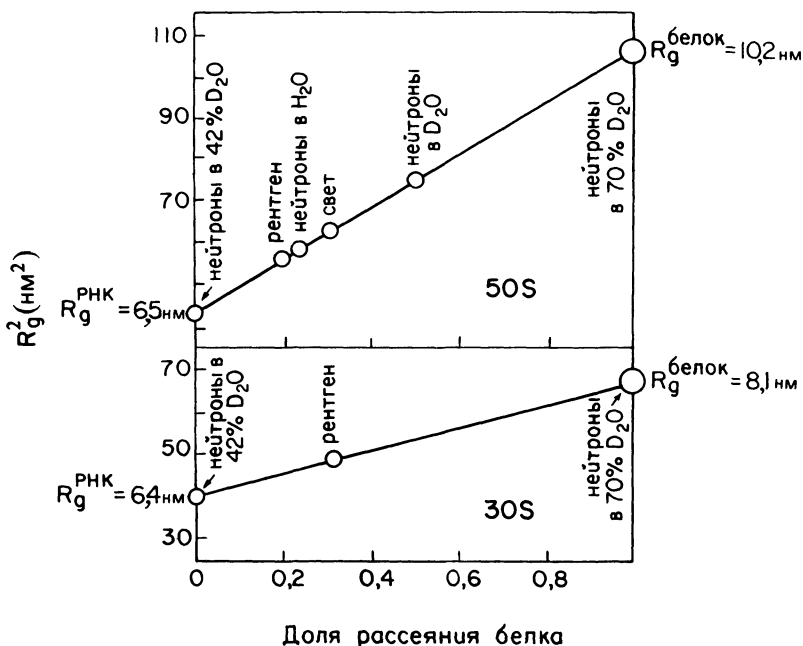


Рис. 62. Зависимость величин радиуса инерции рибосомных частиц, измеряемых путем рассеяния рентгеновских лучей, нейтронов или света, от относительного вклада белкового компонента в рассеяние (предоставлено И. Н. Сердюком, Институт белка АН СССР, Пушкино): 50S частицы показаны на верхнем рисунке, а 30S — на нижнем

жуточное положение. Основываясь на этом факте, можно подобрать такие соотношения H₂O / D₂O в растворителе, когда рассеяния макромолекулы и растворителя будут равны, т. е. данный тип макромолекул будет «не виден» для нейтронов (скомпенсирован по контрасту). Экспериментально найдено, что нейтронное рассеяние белка скомпенсировано в 40–42% D₂O, в то время как РНК не видна для нейтронов в 70% D₂O. Соответственно измерения радиусов инерции рибосомных субчастиц в 42% D₂O дают значения радиуса инерции только рибосомной РНК *in situ*, а измерения в 70% D₂O показывают радиус инерции тотального белкового компонента частицы. Для рибосомной 50S субчастицы *E. coli* эти значения оказались равны 6,5 нм и 10 нм для РНК и белка, соответственно (рис. 62), т. е. РНК в виде ядра сосредоточена преимущественно у центра, а белок в среднем занимает более периферическое положение. В случае рибосомной 30S субчастицы эта разница меньше — 6,5 нм и 8,0 нм для РНК и белка, соответственно (рис. 62). Последнее понятно, так как сама 16S РНК 30S субчастицы хотя и меньше по массе, но и менее компактна по форме (менее изометрична), чем 23S РНК 50S субчастицы, а с другой стороны, белок 30S субчастицы может локализоваться между ветвями (лопастями) 16S РНК.

Сердцевинное положение РНК и более периферическая локализация белков в рибосомных частицах может быть продемонстрирована также с помощью специальной техники электронной микроскопии, где частицы погружены в среды с разной электрон-рассеивающей плотностью. Здесь используется тот же принцип контрастирования, что и в случаях диффузного рассеяния в растворе. Так, когда частицы погружены в глюкозу, то электрон-рассеивающие плотности среды и белкового компонента оказываются уравненными и видна только РНК. В других средах видны как белок, так и РНК. Этим методом удалось подтвердить как тот факт, что РНК образует центральное ядро в рибосомной частице, так и многочисленные указания, что в то же время РНК далеко не вся покрыта белками, а в ряде мест образует поверхность частицы.

Следует отметить, что ядро РНК в рибосомной частице является плотным, т. е. степень свернутости РНК *in situ* высока. Так, из радиуса инерции и кривой рассеяния следует, что объем РНК в 50S субчастице составляет всего около $2 \cdot 10^3$ нм³; это значение всего в два раза больше «сухого» объема РНК. То же верно для 16S РНК в 30S субчастице. Другими словами, плотность упаковки РНК в рибосомной частице оказывается приблизительно такой же, как плотность кристаллической упаковки гидратированных спиралей или тРНК.

2. ТОПОГРАФИЯ БЕЛКОВ

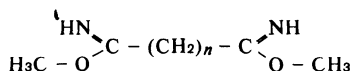
Когда известно сердцевинное положение рибосомной РНК, детальное поверхностное распределение белков, или топография белков, является следующим шагом в познании четвертичной структуры рибосомы. Разработан целый ряд экспериментальных подходов для изучения топографии белков.

Определение соседствующих белков

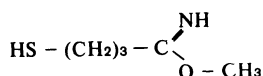
Некоторые сведения о белках-соседях можно извлечь уже из данных о местах связывания белков на первичной и вторичной структуре рибосомной РНК (см. раздел III, 5). Действительно, если места посадки каких-то белков находятся совсем рядом на РНК, то, очевидно, эти белки являются соседями на рибосоме. Например, в приводившемся выше случае белков S8 и S15 они узнают и связывают соседние участки цепи и соседние шпильки во вторичной структуре 16S РНК; очевидно, что белки S8 и S15 — соседи также и топографически. К ним примыкают белки S6 и S18, требующие для своего связывания предварительной посадки белков S8 и S15 и имеющие, как было показано, места узнавания на первичной структуре РНК в том же районе. Другой пример — это соседствование на цепи 16S РНК (в домене I) мест связывания белков S4, S16, S17 и S20.

Более универсальный подход основан на применении бифункциональных химических реагентов для сшивки белков-соседей друг

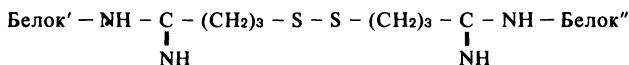
с другом. После обработки рибосомных частиц такими реагентами идентификация белков в сшитых парах устанавливает, что данные белки являются соседями на рибосоме. Наиболее широко применимыми в качестве бифункциональных сшивающих реагентов были диимидозфире с различной длиной углеродной цепи:



Эфирные группы такого реагента активно атакуются ε-аминогруппами лизиновых остатков рибосомных белков с образованием амидинной связи (взамен эфирной). Используя реагенты различной длины, например, диметилсуберимидат ($n=6$) и диметиладипимидат ($n=4$), можно грубо оценивать, насколько близко белки-соседи расположены друг к другу. Некоторую проблему представляет идентификация белков в сшитых парах (поскольку белок уже нельзя выделить в индивидуальном виде); одним из путей является иммунологическая идентификация партнеров в паре, без их разъединения. Другой путь — использование расщепляемых сшивок. Например, рибосомные частицы обрабатываются сульфгидрильным производным имидозфира, таким как метил-4-меркаптобутиримидат:



Он реагирует с аминогруппами белков. Затем производится окисление для образования пар белков через дисульфидные мостики:



Сшитые таким путем пары белков выделяются, дисульфидные связи восстанавливаются, и индивидуальные белки идентифицируются электрофоретически. Следующие пары белков, сшиваемых в 30S субчастице даже короткими реагентами, отмечаются особенно часто: S2-S3, S3-S10, S4-S5, S4-S17, S5-S8, S8-S15, S6-S18, S18-S21, S7-S9, S7-S13, S13-S19; все это, по-видимому, непосредственные соседи на рибосоме. Следует отметить также некоторые пары, образуемые при использовании более длинных реагентов: S3-S5, S3-S9, S4-S8.

Общая схема соседствования белков рибосомной 30S субчастицы, как следует из описанных выше подходов, представлена на рис. 63 (кружки, обозначающие сшиваемые белки, соединены линиями, а те, что являются соседями на РНК, помещены в четырехугольники).

Измерение расстояний между белками

Еще более широко проблема взаимного расположения белков решается измерением расстояний между ними. Однако технически это осуществить гораздо сложнее, чем в предыдущем случае.

Один путь состоит в том, что какие-либо два белка в рибосоме избирательно метятся флюоресцентными группами. Тогда, в за-

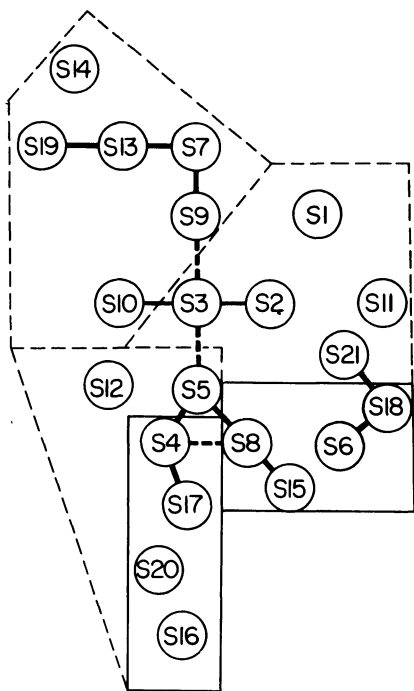


Рис. 63. Схема соседствования белков в рибосомной 30S субчастице:

белки, соединенные сплошной линией, сшиваются коротким реагентом (самый непосредственный контакт); белки, соединенные пунктиром, сшиваются более длинными реагентами; группы белков, обведенные сплошной линией, имеют соседние места связывания на последовательности рибосомной РНК; три группы белков, обведенные пунктирной линией, соответствуют трем доменам РНК и трем морфологическим долям частицы

висимости от типа меток (перекрывания их спектров возбуждения и излучения) и от расстояния между ними, может иметь место большее или меньшее спектральное взаимодействие между ними (синглет-синглетный перенос энергии). Регистрируя изменения в спектрах флюоресценции как меру взаимодействия между метками, можно, таким образом, довольно точно оценивать расстояния между мечеными белками. Этим путем было подтверждено, что белки S7 и S9, S8 и S15, S6 и S18, S20 и S16 / S17 находятся очень близко друг к другу (по-видимому, в непосредственном контакте). Близко друг к другу, согласно измерениям, расположены белки S4 и S20, S4 и S16 / S17, S13 и S19 и некоторые другие. Далеко друг от друга оказались метки белков S4 и S18, S4 и S19, S13 и S16 / S17, S15 и S19, S19 и S20 и др.

Другой путь измерения расстояний между белками основан на использовании нейтронного рассеяния рибосомными частицами с избирательно дейтерированными парами белков. Так как протонированные белки и дейтерированные белки по-разному рассеивают нейтроны, то из сравнения рассеяния от немеченых и меченых частиц можно выделить вклад именно дейтерированной пары, а из него оценить как расстояние между центрами масс двух

белков, так и степень вытянутости (компактности) каждого белка *in situ*. Подбирая состав растворителя (соотношение H_2O/D_2O) так, чтобы скомпенсировать рассеяние от протонированного белка, можно еще более усилить видимый вклад дейтерированной пары. Используя измеренные расстояния между центрами масс белков в многочисленных дейтерированных парах, Р. Мур и Д. Энгельман с сотр. применили геодезический метод триангуляции для построения модели трехмерного расположения рибосомных белков в 30S субчастице *E. coli* (рис. 64). Эти данные показывают, что действительно белки S7, S9 и S10 образуют одну тесную группу, а белки S4, S5, S8 и S12 сгруппированы в другой кластер близких белков; белок S3 находится между ними (ср. с рис. 63). Полученные результаты явились одним из наиболее точных и фунда-

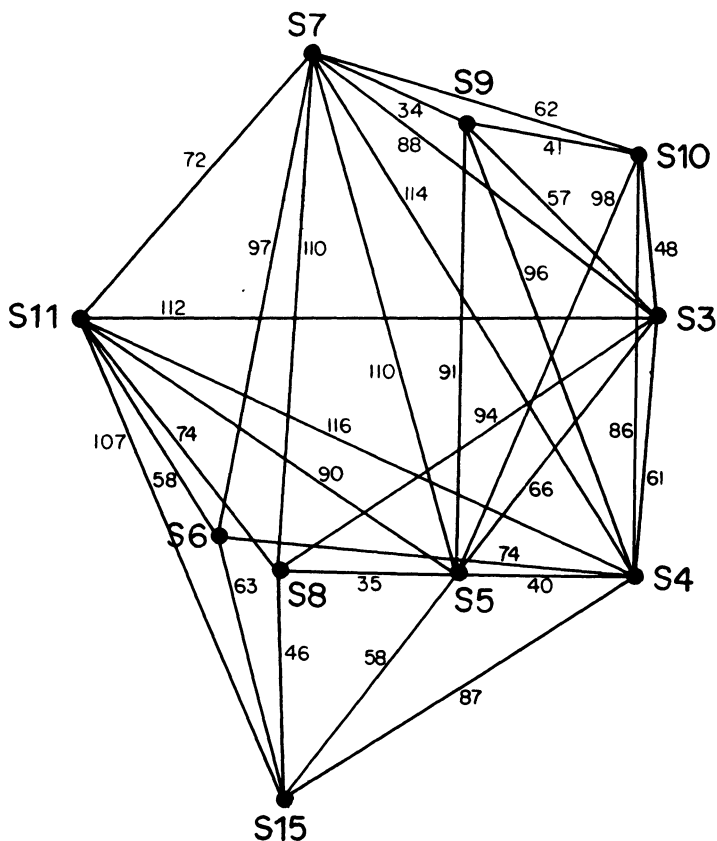


Рис. 64. Триангуляция белков рибосомной 30S субчастицы по данным нейтронного рассеяния (по P. B. Moore et al. J. Mol. Biol., 1977, v. 112, p. 199–234; V. Ramakrishnan et al. J. Mol. Biol., 1981, v. 153, p. 739–760): цифрами указаны расстояния между центрами масс белков в Å (10 Å – 1 нм).

ментальных вкладов в наши знания о расположении белков на рибосомной частице.

Иммунная электронная микроскопия

Подходы, описанные выше, дают сведения о взаимном расположении белков друг относительно друга, но без какой-либо привязки к морфологии рибосомной частицы. Применение электронной микроскопии для визуализации белков на рибосоме позволяет определить местоположение белка на морфологически видимом контуре рибосомной частицы, а в комбинации с вышеописанными данными наложить всю сеть белковой топографии (рис. 63 и 64) на видимые проекции

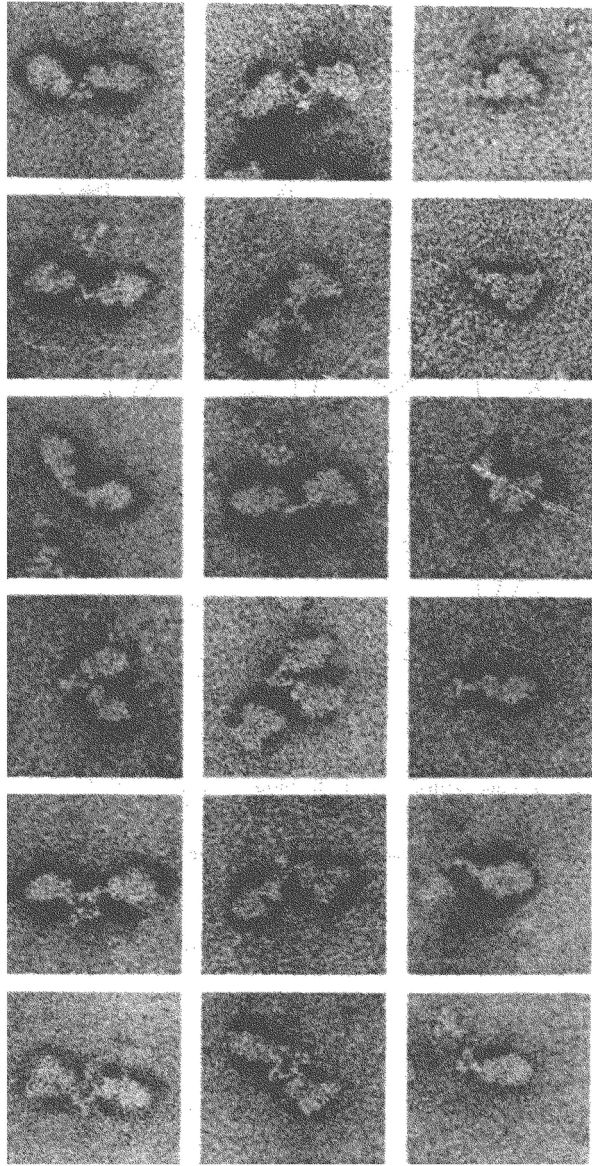


Рис. 65. Электронные микрофотографии рибосомных 30S субчастиц, прореагировавших с антителами против белка S14 (J. A. Lake et al. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1974, v. 71, p. 4688-4692); оригинал предоставлен д-ром Дж. Лейком, Калифорнийский университет, Лос-Анджелес);
 два верхних ряда представляют частицы, димеризованные двувалентной молекулой антитела, нижний ряд — единичные частицы с присоединенной молекулой антитела

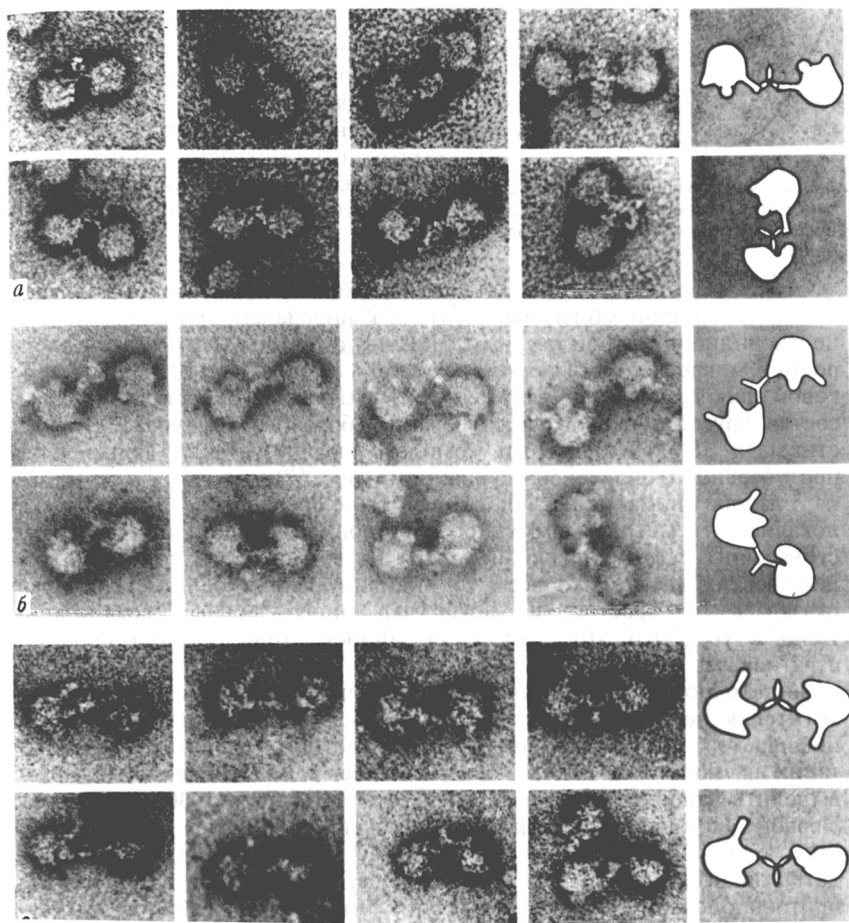


Рис. 66. Электронные микрофотографии рибосомных 50S субчастиц, прореагировавших с антителами: *а* — антитела против белка L7 / L12 (по W. A. Strycharz et al. J. Mol. Biol., 1978, v. 126, p. 123–140); оригинал предоставлен д-ром Дж. Лейком, Калифорнийский университет, Лос-Анджелес); *б* — антитела против белка L1 (предоставлено д-ром Г. Штоффлером, Институт молекулярной генетики им. М. Планка, Зап. Берлин); *в* — антитела против 5S РНК-белкового комплекса; 50S частицы видны с их выпуклой («задней») стороны (предоставлено В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушкино)

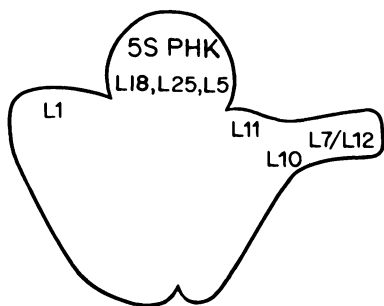


Рис. 67. Контуры рибосомной 50S субчастицы с указанием приблизительно-ного местоположения некоторых белков.

частицы. Для такой электронно-микроскопической визуализации белков на рибосоме было предложено использовать специфические антитела к индивидуальным рибосомным белкам. Двувалентное антитело, связываясь с данным белком, может взаимодействовать одновременно с двумя частицами, давая образование их димера через мостик антитела. Наблюдая димеры в электронный микроскоп, можно определить, какими местами поверхности соединены частицы; это, очевидно, и есть место локализации данного белка на поверхности (рис. 65 и 66). В ряде случаев можно прямо видеть прикреп-

ление Y-образной молекулы антитела к определенному месту поверхности индивидуальной частицы. Именно с помощью иммунной электронной микроскопии было установлено, что белок L7/L12 образует боковой палочкообразный стержень 50S субчастицы, белок L1 входит в состав другого бокового протуберанца (бокового выступа) 50S субчастицы, а 5S PHK-белковый комплекс локализуется в центральном протуберанце (головке) 50S субчастицы (рис. 67).

Главное внимание исследователей было сосредоточено на попытках локализовать методом иммунной электронной микроскопии белки 30S субчастицы *E. coli*. Однако, несмотря на возможность получения специфических антител ко всем 21 индивидуальным белкам, эта задача оказалась не простой, и метод дал много ложных локализаций. Дело в том, что этот метод, кажущийся столь прямым и демонстративным, таит опасности различных артефактов, обусловленных недостаточной очисткой антител, неспецифическим присоединением антител к некоторым участкам поверхности частиц, искажением специфического положения антитела на частице вследствие ее ориентации на подложке и т. д. Тем не менее, в настоящее время можно выделить наиболее надежные результаты в отношении 30S субчастицы. Первой такой надежной локализацией было, по-видимому, определение положения белка S14 на головке частицы (рис. 65); антигенный детерминант белка был найден на поверхности головки со стороны, противоположной боковому выступу («платформе») 30S субчастицы (рис. 68). Недалеко от него были локализованы также антигенные детерминанты белков S10 и S19. Ниже этой группы белков, в районе борозды, разделяющей головку и тело, был локализован белок S3, а еще ниже, близко к борозде, но уже на теле субчастицы, белок S5 (рис. 68). Белки S6 и S11 были локализованы по другую сторону 30S субчастицы, а именно на ее боковом выступе («платформе»). Белок S8, согласно иммунной электронной микроскопии, располагается также у бокового выступа, где-то между ним и телом, на внешней (обращенной от 50S субчастицы) стороне 30S субчастицы.

Особый интерес вызывает локализация белка S4. Дело в том, что

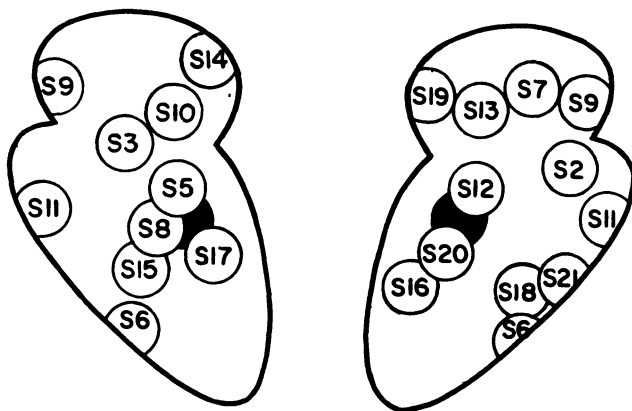


Рис. 68. Контуры рибосомной 30S субчастицы с указанием приблизительного местоположения ее белков: белок S4 обозначен сплошным кружком; слева — сторона 30S субчастицы, обращенная от 50S субчастицы; справа — сторона 30S субчастицы, обращенная к 50S субчастице

именно в отношении этого белка было получено много артефактов, включая ложные множественные антигенные детерминанты по всей частице. В конце концов оказалось, что ряд антигенных детерминант белка S4 не доступен для антител с поверхности частицы, а становится доступным после удаления белков S5 и S12. Действительно, место положения белка S4 было найдено очень близко к месту белка S5, и, очевидно, белок S5, а также белок S12 частично прикрывают собой белок S4 с поверхности. Вообще, белок S4 обнаруживает более или менее центральное положение в 30S субчастице (рис. 68).

3. ТОПОГРАФИЯ РНК

Иммунная электронная микроскопия

Если привязать специфические гаптенные группы (например, динитрофенильную или углеводную) к определенным местам рибосомной РНК или же получить антитела к модифицированным (минорным) основаниям ее, то можно с таким же успехом использовать иммунную электронную микроскопию для изучения топографии РНК на поверхности рибосомной частицы. Таким путем удалось локализовать прежде всего концы рибосомных РНК, к которым легче всего можно избирательно привязать ту или иную гаптенную группировку.

На 30S субчастице *E. coli* местоположение 3'-конца 16S РНК было найдено в районе вершины бокового выступа («платформы») или между ним и головкой (рис. 69, а и в). Приблизительно в том же районе был локализован m²A торцевой петли 3'-концевой шпильки 16S РНК. 5'-конец 16S РНК был локализован в районе тела 30S субчастицы со стороны, противоположной боковому выступу (рис. 69, б и в).

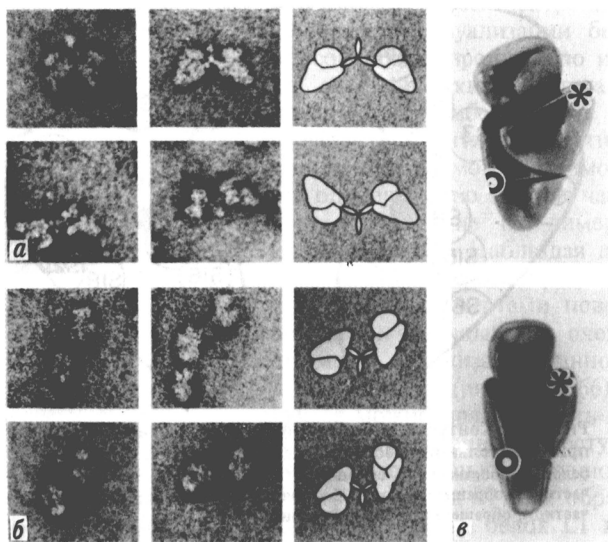


Рис. 69. Электронные микрофотографии рибосомных 30S субчастиц с антителами, присоединенными к модифицированному 3'-концу 16S РНК (а) и 5'-концу 16S РНК (б), а также фотографии двух проекций модели 30S субчастицы с обозначениями местоположений 3'-конца 16S РНК (звездочка) и 5'-конца РНК (кружок) (в) (предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пушкино)

На 50S субчастице *E. coli* место выхода 3'-конца 23S РНК на поверхность (и, следовательно, по-видимому, обоих ее концов) было найдено в районе основания L7/L12 стержня с внешней (обращенной от 30S субчастицы) стороны (рис. 70, б и в). (Этот участок, вероятно, соответствует обоим концам 23S РНК, так как они, согласно современной модели вторичной структуры, замкнуты друг на друга в двойной спирали.) 3'-конец 5S РНК был локализован на головке (центральной протуберанце) 50S субчастицы (рис. 70, а и в), что определило и локализацию всего 5S РНК-белкового комплекса, включающего белки L5, L18 и L25.

Привязка к топографии белков

Зная топографию белков и места посадки белков на первичной (и вторичной) структуре рибосомной РНК, можно, таким образом, вывести более или менее приблизительную топографию белоксвязывающих участков РНК на рибосомной частице. Естественно, что она будет просто повторять локализацию соответствующих рибосомных белков. Так, в районе белка S4 (рис. 68) должна локализоваться составная шпилька, включающая спирали 20–21 домена I, а также спираль 2, являющаяся черешком (спаренные 5'- и 3'-концы домена) всего домена I (рис. 42). Фактически это — центральное место в

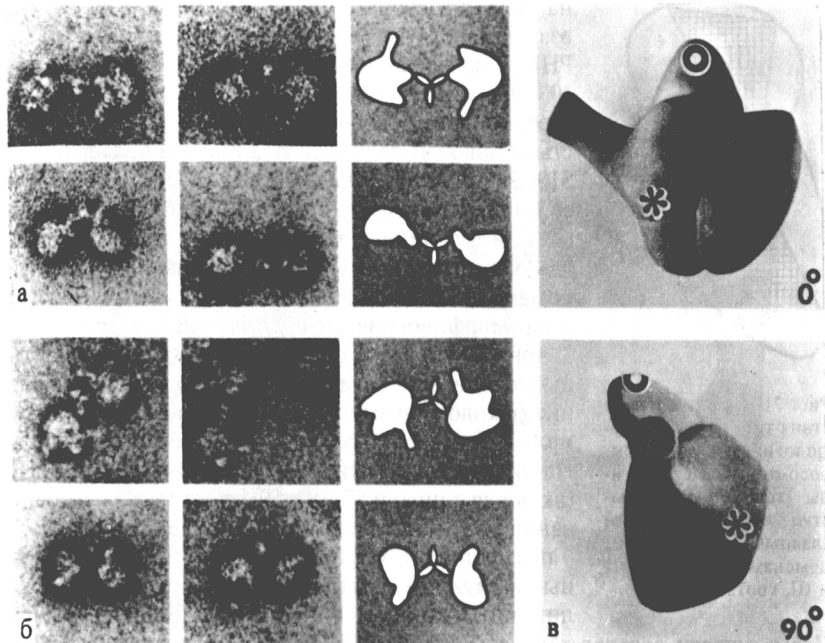


Рис. 70. Электронные микрофотографии рибосомных 50S субчастиц с антителами, присоединенными к модифицированным 3'-концам 5S РНК (а) и 23S РНК (б), а также фотографии двух проекций модели 50S субчастицы с обозначениями местоположений 3'-конца 5S РНК (кружок) и 3'-конца 23S РНК (звездочка) (в) (предоставлены В. Д. Васильевым, Институт белка АН СССР, Пущино)

пространственной структуре 16S РНК, от которого расходятся все три ее главных домена; очевидно, что на морфологической картине Y-образной РНК (рис. 49 и 50) это соответствует району бифуркации.

В районе белка S8 (рис. 68) локализуется составная спираль 25—26 домена II (рис. 42). Так как белки S8 и S4 располагаются близко друг к другу (см. предыдущий раздел, а также рис. 63), то и составная спираль 25—26 домена II должна располагаться где-то в соседстве со шпилькой 20—21 домена I (как и показано схематически на рис. 42).

Наоборот, про белок S7, его непосредственных соседей (белки S9 и S13) и их окружение (белки S10, S14 и S19) известно, что они образуют группу, удаленную от центрального белка S4. Соответственно, узловой район домена III 16S РНК (куда сходятся спирали 39, 40, 52 и 55), связывающий белок S7, должен быть удален от черешка домена I и от бифуркации Y-образной РНК.

Говоря в общем о топографии главных доменов 16S РНК и их соотношении с главными морфологическими долями рибосомной 30S субчастицы (тело, боковой выступ и головка), можно исходить как раз из известных фактов о размещении белков на РНК и на 30S субчастице. Эти факты следующие. 1. Белки S4, S16, S17 и S20 связаны с 5'-концевым доменом I и в то же время обнаруживаются, как и сам 5'-конец РНК,

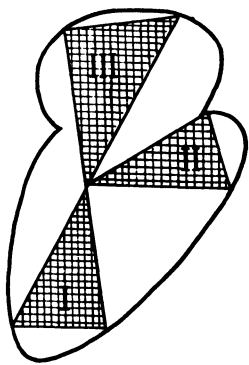


Рис. 71. Схема соответствия трех главных морфологических долей рибосомной 30S субчастицы (тело, боковой выступ и головка) трем главным структурным доменам 16S РНК (I, II и III, соответственно)

на теле 30S субчастицы. 2. Белки S8, S15, S6, S18 взаимодействуют с срединным доменом II 16S РНК, а на морфологически видимом изображении 30S субчастицы они локализируются либо непосредственно на ее боковой доле («платформе»), либо на стыке боковой доли и тела. 3. Группа белков S7, S9, S10, S13, S14 и S19 прикреплена к 16S РНК в районе ее 3'-проксимального домена III, а на 30S субчастице все они — типичные компоненты ее головки. Отсюда можно утверждать, что три главных структурных домена 16S РНК в общем соответствуют трем главным морфологическим долям 30S субчастицы: 5'-концевой домен I формирует ядро тела субчастицы, срединный домен II вносит вклад в образование бокового выступа («платформы»), а 3'-проксимальный домен III заполняет головку субчастицы. По-видимому, самый 3'-концевой участок 16S РНК (включая спирали 57, 58 и 59) простирается от основания головки («шеи») к верхушке боковой доли («платформы»), как об этом свидетельствуют данные иммунной электронной микроскопии по локализации 3'-конца и 3'-концевой шпильки (рис. 69).

Схематически соответствие доменов 16S РНК и морфологических долей 30S субчастицы показано на рис. 71.

4. ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА

Полное решение проблемы точного взаиморасположения всех структурных элементов рибосомной частицы, включая белки и их группы, компактные домены РНК, отдельные спирали РНК и т. д., ждет получения подходящих кристаллов частиц и их рентгенографического, электронографического или нейтронографического изучения, с тем или иным разрешением. Обнадуживает то, что принципиально рибосомные частицы оказались кристаллизуемыми.

Однако из всей совокупности данных, изложенных выше, уже сейчас можно пытаться строить приблизительные модели взаимного расположения белков и РНК, в той или иной мере отражающие четвертичную структуру рибосомных частиц с грубым разрешением. Это особенно верно для рибосомной 30S субчастицы, в отношении которой существует гораздо больше сведений (и которая в то же время вдвое меньше), чем о 50S субчастице. Одна из таких грубых моделей размещения 21 рибосомных белков, аппроксимированных сферами с диаметром, соответствующим их молекулярным массам, на Y-образной РНК, форма которой выведена из электронной микроскопии, дана на рис. 72.

Хотя данные по диффузному рассеянию рентгеновских лучей или нейтронов суспензиями рибосомных частиц нельзя прямо интерпретировать в структурном плане, но их можно использовать для проверки

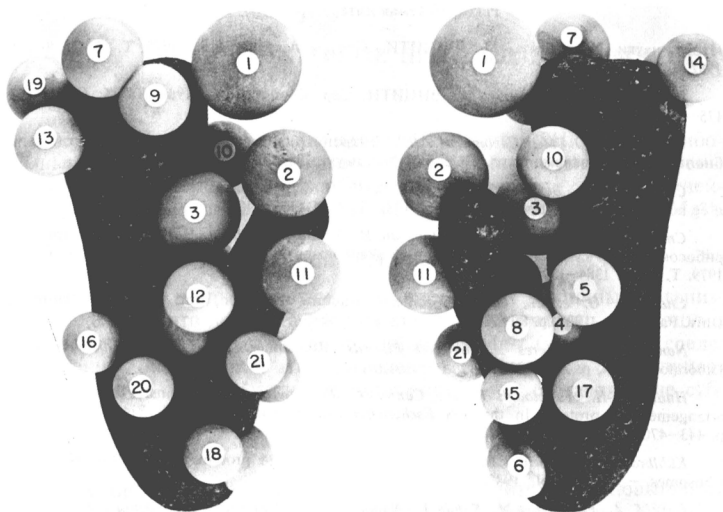


Рис 72. Фотография двух проекций предварительной модели взаиморасположения Y-образной РНК и 21 белка (четвертичной структуры) в рибосомной 30S субчастице (по А С Спируну и др Молек биол, 1979, т. 13, с 1384—1395)

предлагаемых моделей. Например, можно теоретически рассчитать кривые рассеяния, которые давали бы частицы, соответствующие модели, при различном рассеивающем вкладе белка и РНК. Размеры и форму РНК в модели можно проверять, сравнивая теоретически рассчитанную кривую при нулевом вкладе белка с экспериментальной кривой нейтронного рассеяния в 42%-ном D_2O , когда рассеяние от белка скомпенсировано растворителем. С другой стороны, характер взаиморасположения белков в модели можно тестировать путем сравнения рассчитанной из модели кривой при нулевом вкладе РНК с экспериментальной кривой нейтронного рассеяния в 70%-ном D_2O (точка компенсации рассеяния РНК растворителем). Наконец, задавая различные вклады белка и РНК при расчетах рассеяния от модели, можно получить набор теоретических кривых для сравнения с экспериментальными кривыми нейтронного рассеяния в H_2O , D_2O и при различных их соотношениях, а также с кривыми рентгеновского рассеяния; этим путем проверяется взаимное расположение белка и РНК в модели. Если соответствия между рассчитанными и экспериментальными кривыми не будет, модель должна быть отвергнута. Модель расположения РНК и белков в 30S субчастице, изображенная на рис. 72, не противоречит экспериментальным кривым нейтронного и рентгеновского рассеяния вплоть до разрешения около 4—5 нм.

Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ. Сер. молекул. биол., 1975. Т. 5. С. 8—151; 1982. Т. 17. С. 5—65.

Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ. Сер. биол. химия, 1981. Т. 15. С. 78—115; 175—233.

Останевич Ю. М.; Сердюк И. Н. Нейтронографические исследования структуры биологических макромолекул. — Успехи физ. наук., 1982. Т. 137. С. 85—116.

Спирин А. С., Васильев В. Д., Сердюк И. Н. Структурные исследования рибосомы и ее компонентов. — Кристаллография, 1981. Т. 26. С. 1053—1065.

Спирин А. С., Сердюк И. Н., Шпунгин И. Л., Васильев В. Д. Четвертичная структура рибосомной 30S субчастицы: модель и ее экспериментальная проверка. — Молекул. биол., 1979. Т. 13. С. 1384—1395.

Chambliss G. et al., eds. Ribosomes: Structure, Function, and Genetics. Baltimore: Univ. Park Press, 1980, p. 89—236.

Nomura M., Tissieres A., Lengvel P., eds. Ribosomes. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974, p. 271—331.

Huang K.-H., Fairclough R. H., Cantor C. R. Singlet energy transfer studies of the arrangement of proteins in the 30S *Escherichia coli* ribosome. — J. Mol. Biol., 1975, v. 97, p. 443—470.

Kühlbrandt W., Unwin P.N.T. Distribution of RNA and protein in crystalline eukaryotic ribosomes. — J. Mol. Biol., 1982, v. 156, p. 431—448.

Lake J. A., Pendergast M., Kahan L., Nomura M. Localization of *Escherichia coli* ribosomal proteins S4 and S14 by electron microscopy of antibody-labeled subunits. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1974, v. 71, p. 4688—4692.

Litjas A. Structural studies of ribosomes. — Prog. Biophys. Mol. Biol., 1982, v. 40, p. 161—228.

Olson H. M., Glitz D. G. Ribosome structure: Localization of 3'-end of RNA in small subunit by immunoelectron microscopy. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1979, v. 76, p. 3769—3773.

Serdyuk I. N., Grenader A. K. Joint use of light, X-ray and neutron scattering for investigation of RNA and protein mutual distribution within the 50S particle of *E. coli* ribosomes. — FEBS Lett., 1975, v. 59, p. 133—136.

Serdyuk I. N., Grenader A. K., Zaccai G. Study of the internal structure of *Escherichia coli* ribosomes by neutron and X-ray scattering. — J. Mol. Biol., 1979, v. 135, p. 691—707.

Serdyuk I. N., Smirnov N. I., Ptitsyn O. B., Fedorov B. A. On the presence of a dense internal region in the 50S subparticle of *E. coli* ribosomes. — FEBS Lett., 1970, v. 9, p. 324—326.

Shatsky I. N., Evstafieva A. G., Bystrova T. E. et al. Topography of RNA in the ribosome: Location of the 3'-end of 5S RNA on the central protuberance of the 50S subunit. — FEBS Lett., 1980, v. 121, p. 97—100.

Shatsky I. N., Mochalova L. V., Kojouharova M. S. et al. Localization of the 3'-end of *Escherichia coli* 16S RNA by electron microscopy of antibody-labelled subunits. — J. Mol. Biol., 1979, v. 133, p. 501—515.

Stuhrmann H. B., Haas J., Ibel K., et al. New low resolution model for 50S subunit of *Escherichia coli* ribosomes. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1976, v. 73, p. 2379—2383.

Tischendorf G. W., Zeichhardt H., Stöffler G. Architecture of the *Escherichia coli* ribosome as determined by immune electron microscopy. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1975, v. 72, p. 4820—4824.

Wittmann H. G. Architecture of prokaryotic ribosomes. — Ann. Rev. Biochem., 1983, v. 52, p. 35—65.

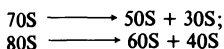
Глава V

СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ РИБОСОМ (*IN VITRO*)

Взаимодействия между рибосомными РНК и внутри РНК, между рибосомными белками и между белками и РНК в рибосоме очень подвержены влиянию внешних условий и особенно ионных условий среды. Важнейшую роль играют двухвалентные катионы и в первую очередь Mg^{2+} .

1. ДИССОЦИАЦИЯ РИБОСОМ НА СУБЧАСТИЦЫ

Уже при первых попытках выделения рибосом из различных организмов стало ясно, что для поддержания стабильности частиц необходимо присутствие достаточных концентраций ионов Mg^{2+} (или Ca^{2+}) в среде. Понижение концентрации этих двухвалентных катионов в среде приводило в первую очередь к диссоциации рибосом на составляющие субчастицы:



Такую же диссоциацию можно вызвать путем значительного повышения концентрации одновалентных катионов в среде. Диссоциация 70S рибосом *E. coli* при понижении концентрации Mg^{2+} в среде показана на седиментационных диаграммах (рис. 73).

Открытие диссоциации рибосом сыграло очень большую роль в их дальнейшем изучении. Именно разделение субчастиц и их выделение послужило отправной точкой для структурных исследований отдельно большой и малой субчастицы, для выделения и изучения индивидуальных 16S (18S) и 23S (28S) рибосомных РНК, для выделения и изучения рибосомных белков каждой субчастицы. Кроме того, стало возможным изучение парциальных функциональных активностей на изолированных рибосомных субчастицах, таких как связывание матричной РНК, связывание аминоксил-тРНК, пептидилтрансферазная функция, связывание и гидролиз ГТФ и т. п.

Необходимость достаточных концентраций Mg^{2+} или Ca^{2+} в среде (не менее 1 мМ) для поддержания ассоциированного состояния рибосом прежде всего связана, по-видимому, со структурно-функциональными особенностями рибосомной РНК. РНК в рибосоме находится преимущественно в виде Mg^{2+} -соли. Связанный Mg^{2+} ответствен за то, что отрицательные заряды фосфатов РНК в основном нейтрализованы, полиэлектролитные свойства РНК не проявляются и тесные РНК-РНК-взаимодействия могут быть разрешены. Понижение концентрации Mg^{2+} в среде (или повышение конкурентной концентрации одновалентного катиона) приводит к частичному удалению Mg^{2+} из рибосомы, что должно сказаться прежде всего на слабых РНК-РНК-взаимодействиях. Похоже на то, что диссоциация рибосом на субчастицы обусловлена прежде всего нарушением или ослаблением каких-то локальных контактов 16S (18S) РНК малой субчастицы с 23S (28S) РНК большой суб-

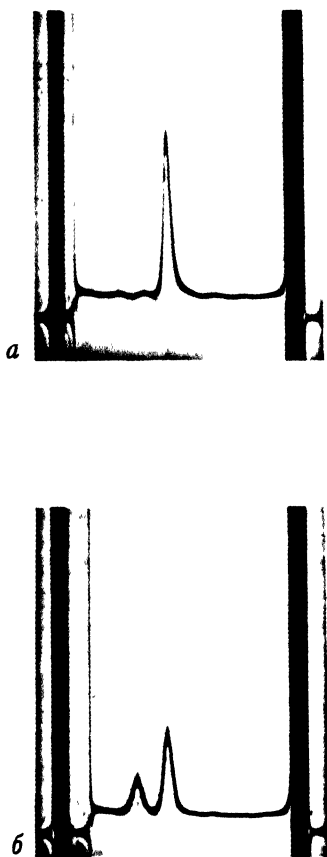


Рис. 73. Седиментационные диаграммы исходных 70S рибосом *E. coli* и продуктов их диссоциации на 30S и 50S субчастицы при понижении концентрации Mg^{2+} в среде: а — 70S рибосомы при 10 мМ $MgCl_2$ — 100 мМ NH_4Cl ; б — 30S и 50S субчастицы при 1 мМ $MgCl_2$ — 100 мМ NH_4Cl

частицы. Действительно, изолированные 16S РНК и 23S РНК в условиях относительной компактности, включающих высокую концентрацию Mg^{2+} в среде, способны взаимодействовать друг с другом.

Эксперименты по химической модификации рибосом и их субчастиц с помощью кетоксала указали на два главных района 16S РНК, участвующих в ассоциации субчастиц: это, во-первых, две соседние составные шпильки, включающие спирали 29—30—31 и 32—33 серединного домена II, и, во-вторых, 3'-концевая последовательность. Оказалось, что некоторые гуаниловые остатки неспаренных участков этих районов (между спиралями 29 и 30, 30 и 31, 32 и 33, 32 и 34 и в торцевой петле спирали 33, с одной стороны, и между спиралями 38 и 57, 57 и 59 и в торцевой петле спирали 59, с другой) реагируют с кетоксалем в изолированной 30S субчастице и перестают реагировать после ассоциации с 50S субчастицей. Если эти остатки модифицированы кетоксалем, то 30S субчастица теряет способность к ассоциации с 50S субчастицей. Интересно, что ассоциация с 50S субчастицей вызывает также некоторую перестройку структуры РНК в 30S субчастице, приводящую к увеличению доступности нуклеотидных остатков в районе составной спирали 45—46—47 домена III 16S РНК. Исходя из локализации указанных районов РНК (см. предыдущий раздел), можно думать, что 30S субчастица осуществляет контакт с 50S субчастицей главным образом своей боковой лопастью («платформой») и головкой;

выходы 16S РНК в этих местах, по-видимому, ответственны за взаимодействие с субчастицей-партнером.

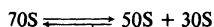
В 23S РНК 50S субчастицы также можно указать участки, вовлеченные во взаимодействие с 30S субчастицей при их ассоциации. Они оказались сосредоточены главным образом в домене, образуемом последовательностью 2043—2625 (домен V). Интересно, что с этим же доменом

взаимодействует, по-видимому, 5S РНК-белковый комплекс головки 50S субчастицы и белок L1 боковой доли 50S субчастицы. Очень вероятно, что именно головка и боковая доля 50S субчастицы осуществляют ее ассоциацию с 30S субчастицей («головка к головке» и «боковая доля к боковой доле» — см. раздел Б.1).

В предыдущих разделах уже указывалось, что головка 50S субчастицы включает 5S РНК-белковый комплекс. Оказалось, что этот комплекс сам по себе обнаруживает способность взаимодействовать с 30S субчастицей. Это может служить указанием на то, что 5S РНК-белковый комплекс также вносит вклад в ассоциацию рибосомных субчастиц («головка к головке»).

Роль отдельных рибосомных белков в ассоциации субчастиц изучена слабо. Исключать ее, однако, нельзя. Она может состоять как в стабилизации структур РНК, осуществляющих ассоциацию, так и в непосредственном вкладе в межсубчастичные контакты.

Давно известно, что абсолютная концентрация ионов Mg^{2+} в среде, требуемая для поддержания ассоциации рибосомных субчастиц, сильно зависит от функционального состояния рибосомы, и прежде всего от связанных с ней лигандов. Так, субчастицы в транслирующей рибосоме соединены особенно прочно, и для диссоциации требуется сильно понизить концентрацию Mg^{2+} в среде (вплоть до 10^{-4} М или даже ниже). Транслирующие рибосомы в посттранслокационном состоянии диссоциируют, по-видимому, несколько легче, чем претранслокационные рибосомы. Помимо возможного изменения способа ассоциации самих субчастиц в различных функциональных состояниях, оказалось, что связанные тРНК сами вносят большой вклад в устойчивость ассоциированного состояния рибосомы. Разницу в устойчивости претранслокационных и посттранслокационных рибосом, в частности, можно объяснить тем, что первые содержат две молекулы тРНК на рибосому, а вторые — одну. Вклад тРНК в стабилизацию ассоциации субчастиц можно понять: каждый тРНК-связывающий участок на рибосоме формируется центрами обеих субчастиц (см. последующие разделы), так что тРНК связывается с обеими, образуя дополнительный скрепляющий «мостик». В отсутствие лигандов (тРНК) рибосомные субчастицы скреплены относительно слабо. Во всяком случае, нетранслирующие свободные 70S рибосомы *E. coli* полностью диссоциируют уже при концентрациях Mg^{2+} ниже 5 мМ, а при более высоких концентрациях находятся в динамическом равновесии с субчастицами:



Эукариотические 80S рибосомы гораздо устойчивее к понижению Mg^{2+} в среде.

Необходимо отметить также некоторые внешние факторы, как способствующие, так и противодействующие ассоциации рибосомных субчастиц (рис. 74). Уже говорилось, что увеличение концентрации одновалентных катионов (K^+ , NH_4^+ и др.) всегда способствует диссоциации, и чем больше их концентрация, тем требуется больше Mg^{2+} для поддержания ассоциированного состояния. Здесь, несомненно, играет роль прямой конкурирующий эффект (вытеснение Mg^{2+} из рибосомы).

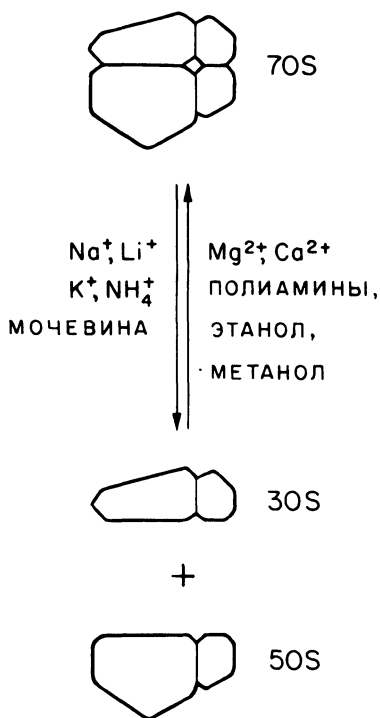


Рис. 74. Схема диссоциации рибосом на составляющие субчастицы. Указаны некоторые факторы среды, способствующие или противодействующие диссоциации

Однако наблюдается и интересная специфичность: Na^+ и Li^+ оказывают сильный диссоциирующий эффект даже в низких концентрациях. Для поддержания ассоциированного состояния рибосом Mg^{2+} в среде может быть полностью или частично заменен на Ca^{2+} , а также на Mn^{2+} и Co^{2+} (все это — катионы с близким ионным радиусом), в то время как Sr^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и другие дву- и поливалентные катионы либо неэффективны, либо обладают диссоциирующим действием. Органические поликатионы, такие как диамины (путресцин, кадаверин) и полиамины (спермидин, спермин), стабилизируют ассоциацию и могут рассматриваться как мощные синергисты Mg^{2+} ; по-видимому, они всегда присутствуют в каком-то количестве в рибосомах, внося вклад в стабилизацию третичной структуры рибосомной РНК и в РНК-РНК-взаимодействия. Интересно, что синергистами Mg^{2+} , могущими частично заменить его в среде для поддержания ассоциированного состояния рибосом, являются также многие водорастворимые органические растворители, такие как метанол, этанол, диметилсульфоксид, и другие; их антидиссоциирующее действие приблизительно

пропорционально их гидрофобности. В связи с этим стоит сказать, что добавление этих же растворителей в среду оказалось очень эффективным для поддержания компактной структуры изолированной рибосомной РНК.

In vivo диссоциация 70S или 80S рибосом на составляющие субчастицы происходит только после терминации трансляции. В этом случае связь между субчастицами ослабляется вследствие ухода лигандов (пептидил-тРНК и тРНК) и диссоциация, по-видимому, дополнительно еще и катализируется специальными белковыми факторами. Диссоциация рибосом на субчастицы после окончания трансляции матрицы — обязательный этап в их циклическом использовании в клетке (см. часть В).

2. РАЗВОРАЧИВАНИЕ СУБЧАСТИЦ

Если продолжать удалять Mg^{2+} из рибосомных частиц, то произойдет нарушение их компактности, т. е. разворачивание, без диссоциации белка от РНК. Чтобы достигнуть разворачивания, было предложено два главных способа для удаления Mg^{2+} из рибосомных частиц: либо конкурентное вытеснение связанного Mg^{2+} высокой концентрацией одно-

валентного катиона (например, 1 M NH_4^+) в среде, с последующим уменьшением ионной силы, либо прямое уведение Mg^{2+} комплексирующим агентом (например, этилендиаминтетраацетатом) при низкой ионной силе. Очевидно, что удаление связанного Mg^{2+} и низкая ионная сила среды приводят к проявлению полиэлектролитных свойств рибосомной РНК. Вследствие возникающего электростатического отталкивания отрицательно заряженных фосфатных групп, сосредоточенных в относительно малом объеме частицы, компактная укладка РНК разрушается. Можно показать, что разрушаются в основном дальние взаимодействия, в то время как большая часть вторичной структуры РНК сохраняется, при условии, если ионная сила не очень низка.

В то же время белки продолжают висеть на разрыхленной высокополимерной РНК, т. е. имеет место разворачивание **рибонуклеопротейда**. Сохранение многих РНК-белковых взаимодействий при разворачивании свидетельствует о том, что локальные места узнавания на РНК, в том числе элементы локальной пространственной структуры, необходимые для удержания белков, могут продолжать существовать после нарушения общей укладки, а также о том, что Mg^{2+} вряд ли играет решающую роль в связывании белков с РНК. Более того, уменьшение ионной силы, требуемое для разворачивания, может стабилизировать ионные взаимодействия основных групп белков с отрицательно заряженной РНК, которые несомненно играют важную роль в удержании белков в рибосомном нуклеопротейде (см. Б.В.3). Не исключено, что при разворачивании рибосомных частиц, особенно при интенсивном разворачивании, когда ионная сила очень низка и начинается разрушение спиралей, некоторые белки могут перераспределяться на цепи РНК и удерживаться неспецифически, за счет простых электростатических взаимодействий. (Следует оговориться, что некоторые слабо удерживаемые белки, а также 5S РНК, могут освобождаться из рибонуклеопротейда при разворачивании.)

Характерной чертой процесса разворачивания рибосомных субчастиц является то, что он носит кооперативный характер и проходит через определенные дискретные стадии. Проще всего следить за процессом разворачивания по уменьшению седиментационных коэффициентов частиц (уменьшение седиментационных коэффициентов сопровождается увеличением характеристической вязкости, уменьшением коэффициента диффузии и увеличением радиуса инерции). Когда связанный Mg^{2+} в значительной мере вытеснен из частиц, то постепенное уменьшение ионной силы среды приводит к следующей динамике изменений. Сначала исходные 50S и 30S компоненты превращаются непосредственно в 35S и 26S компоненты, соответственно; этот переход является скачкообразным, типа «все или ничего», и в промежуточных условиях обе формы, исходная и развернутая, могут сосуществовать на седиментационной диаграмме (рис. 75). Затем при дальнейшем понижении ионной силы 35S и 26S компоненты так же скачкообразно переходят в 22S и 15S компоненты, соответственно. Последние ведут себя уже как типичные полиэлектролиты, полностью напоминая некомпактные формы 23S и 16S РНК; удаление солей из раствора приводит к их дальнейшему, теперь уже плавному, разворачиванию, сопровождаемому разрушением вто-

ричной структуры и падением коэффициентов седиментации до значений около 5S в воде (рис. 75). Итак,

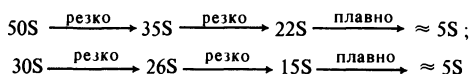


Схема разворачивания рибосомных частиц дана на рис. 76.

Открытие явления разворачивания рибосомных частиц (1963) впервые указало на ряд принципиальных черт структурной организации рибосом. Прежде всего, оно показало, что каждая рибосомная частица может рассматриваться как компактно свернутый рибонуклеопротеидный тяж, где роль ковалентно-непрерывного остова играет рибосомная РНК. Далее, стало ясно, что сворачивание этого рибонуклеопротеидного тяжа в компактную рибосомную структуру определяется прежде всего взаимодействиями внутри РНК, так как именно их нарушение приводит к разворачиванию. Теперь, зная, что РНК образует более или менее центральное ядро частицы, а белок локализован больше на периферии, можно проводить аналогию между сворачиванием рибонуклеопротеидного тяжа в компактную рибосомную частицу и сворачиванием полипептидной цепи в белковую глобулу; в обоих случаях свернутость тяжа означает сегрегацию двух химически различных фаз, одна из которых (РНК в рибосоме или гидрофобные группы в белке) оказывается преимущественно внутри, а другая (белки в рибосоме или гидрофильные группы в белке) — снаружи.

Ступенчатый (типа «все или ничего») характер первых стадий разворачивания может служить указанием на то, что нарушение компактности рибонуклеопротеида начинается с разрывов уникальных связей, фиксирующих общую свернутость. Такими первыми стадиями могут быть нарушения компактизирующих связей между главными долями рибосомной частицы или между доменами высокополимерной РНК. Дальнейшее разворачивание может включать в себя более или менее кооперативное «плавление» внутридоменной третичной структуры, а уже затем, в процессе полного удаления солей, постепенное выплавление отдельных спиралей.

В целом рибосомный рибонуклеопротеид ведет себя очень похоже на изолированную высокополимерную рибосомную РНК, несмотря на присутствие большого количества белков. Однако компактная структура рибонуклеопротеида всегда оказывается существенно стабильнее как к удалению Mg^{2+} , так и к понижению ионной силы, а также к нагреванию. Более того, изолированная РНК не достигает состояния своего максимально компактного сворачивания, свойственного ей в составе рибосомной частицы, или, во всяком случае, оно не стабильно, пока с ней не связан определенный минимальный набор белков (см. Б. V.3). Создается впечатление, что вся специфичность сворачивания рибонуклеопротеида определяется его РНК (формированием третичной структуры РНК), в то время как белки стабилизируют отдельные ключевые элементы структуры РНК, включая некоторые спирали РНК. Именно с этим может быть связан также и более скачкообразный (более кооперативный) характер разворачивания рибосомной частицы по сравнению с развора-

чиванием изолированной РНК. Специфическая стабилизация определенными белками неустойчивых состояний элементов третичной и вторичной структуры РНК может быть общим принципом не только структурной организации рибосом, но и функционирования любых белково-нуклеиновых систем (см., например, раздел В. VI. 7).

Из явления разворачивания рибосомной частицы в рибонуклеопротеидный тяж, без отделения рибосомных белков, прямо следовало важнейшее заключение, что именно ковалентно-непрерывная РНК удерживает на себе многочисленные рибосомные белки, являясь, таким образом, структурным каркасом для их размещения. В свое время это был новый принцип, так как изученные ранее случаи вирусных нуклеопротеидов представляли противоположный пример симметричной самоукладки белков в специфическую четвертичную структуру, с подгонкой РНК под нее. Действительно, формирование рибосомной частицы не может быть осу-

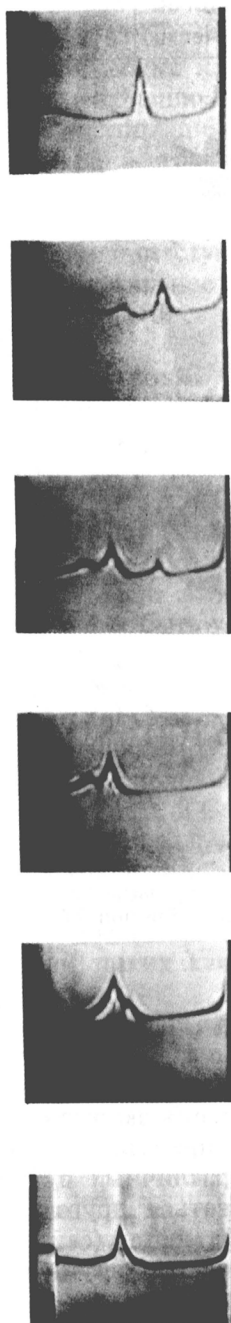


Рис. 75. Седиментационные диаграммы рибосомных 50S субчастиц по мере их разворачивания путем понижения ионной силы (по L. P. Gavrilova et al. J. Mol. Biol., 1966, v. 16, p. 473-489): предварительно 50S субчастиц были обработаны высокой концентрацией NH_4Cl для обеднения Mg^{2+} , разворачивание прослеживается как дискретные переходы в состояния с пониженными коэффициентами седиментации, без деградации частиц; концентрации NH_4Cl указаны слева; коэффициенты седиментации приведены под каждой диаграммой.

Морфология (схематически)	Коэффициент сегментации	Молекуляр- ная масса, дальтоны	Содержа- ние белка %	Плавучая плотность в CsCl, г/см ³
------------------------------	----------------------------	--------------------------------------	----------------------------	--

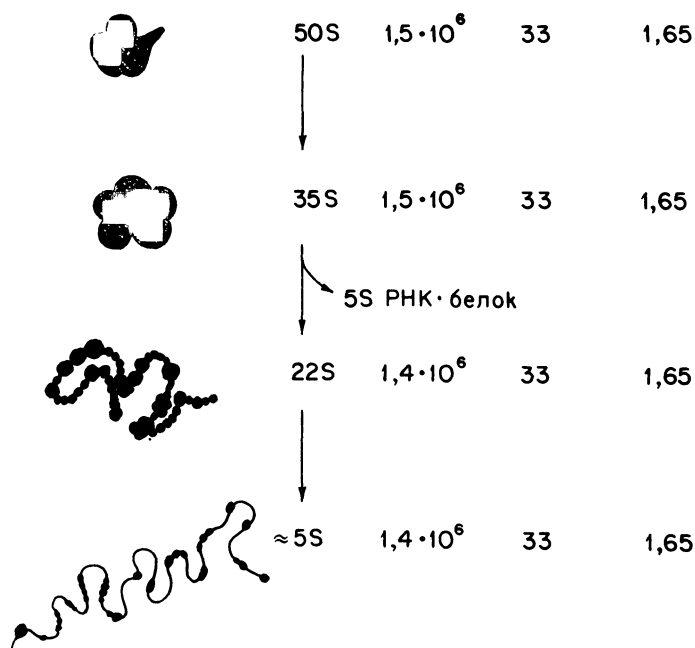


Рис. 76. Схема разворачивания рибосомной 50S частицы при удалении Mg^{2+} и понижении ионной силы

ществлено по принципу самосборки идентичных белковых субъединиц или субъединиц нескольких типов в симметричную структуру. Почти все белковые субъединицы рибосомы различны, будучи, как правило, представлены в одном экземпляре на частицу. Более того, таких различных субъединиц много. Поэтому здесь должен был реализоваться другой принцип самосборки: специфическая к определенным местам (сайт-специфическая) посадка многочисленных различных белков на уникальный ковалентно-непрерывный каркас или заготовленную «сердцевинную» пространственную структуру. Эксперименты по разборке и обратной самосборке рибосомных частиц, логически вытекавшие из явления разворачивания, действительно были осуществлены (см. Б. V.3) и явились полным подтверждением каркасной роли рибосомной РНК для размещения рибосомных белков.

Разборка

Если рибосомные частицы инкубировать при высоких ионных силах, поддерживая также и достаточно высокую концентрацию Mg^{2+} , то компактность частиц сохраняется, но наблюдается диссоциация рибосомных белков. Очевидно, что это происходит прежде всего как результат ослабления удержания белков на РНК вследствие подавления их электростатических взаимодействий. Как в условиях инкубации при постоянной высокой концентрации соли, так и при ступенчатом повышении ионной силы имеет место последовательное отщепление групп белков с образованием серии белок-дефицитных производных, т. е. ступенчатая разборка рибосомных частиц.

Так как разборка сопровождается увеличением отношения РНК: белок в частицах, то за ее ходом удобно следить по увеличению плавучей плотности частиц, например, методом изопикнического равновесного центрифугирования в градиенте концентрации CsCl. На рис. 77 показано появление серии белок-дефицитных производных из рибосомных 50S и 30S субчастиц *E. coli* под действием 5 М CsCl (в присутствии 2 мМ $MgCl_2$). Схема отщепления белков 30S субчастицы под действием увеличивающейся концентрации LiCl при 5 мМ $MgCl_2$ дана на рис. 78. Сначала, в результате инкубации в 1 М соли, могут быть удалены такие относительно слабо удерживаемые белки, как S1, S2, S3, S14, S21; остаются 28S частицы, имеющие содержание белка 30% и, соответственно, плавучую плотность в CsCl 1,67 г/см³. Инкубация в 2 М LiCl приводит к отщеплению следующей порции белков: S5, S9, S10, S12, S13, S20; получающиеся 25S частицы содержат почти половину исходного содержания белка (20%) и имеют плавучую плотность в CsCl 1,74 г/см³. В интервале от 3 М до 3,5 М LiCl отщепляются сначала белки S6, S18, S11 и S19, а затем белки S16 и S17, так что в конце концов получают 23S частицы, содержащие только 4 рибосомных РНК-связывающих белка, а именно S4, S7, S8 и S15. Отщепление этих последних белков требует уже применения более жестких воздействий, таких как комбинация высокой соли с мочевиной.

Отщепление большей части белков, по-видимому, не сопровождается нарушением общей третичной структуры и компактности рибосомной РНК. Электронно-микроскопическое прослеживание за процессом раздевания 30S субчастицы *E. coli* показало, что удаление половины белков не приводит к сколько-нибудь значительным морфологическим изменениям частиц: они сохраняют те же размеры, то же соотношение осей (2:1) и то же характерное подразделение на головку, тело и боковую лопасть. Более того, внешне такие же частицы видны и после удаления 15 из 21 белка. Проверка компактности рибосомной РНК в частицах с различным содержанием белков с помощью рентгеновского и нейтронного рассеяния подтверждает электронно-микроскопические наблюдения: РНК, удерживающая всего 6 белков, таких как S4, S7, S8, S15, S16 и S17, сохраняет компактность и форму, свойственную ей в составе 30S субчастицы.

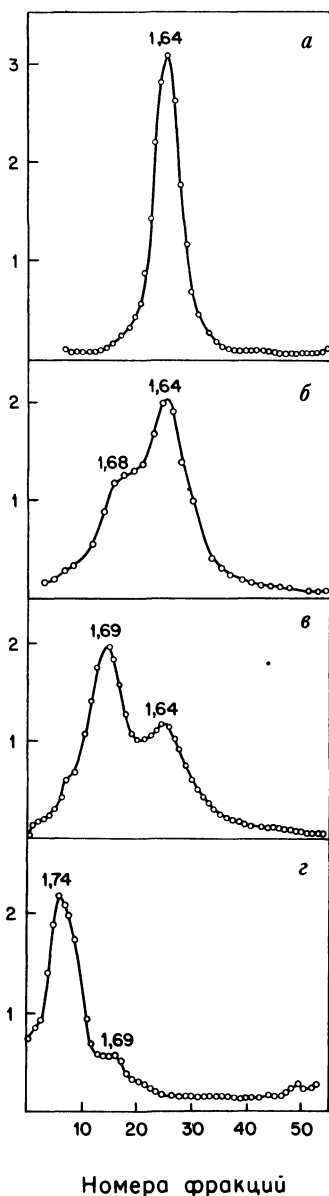


Рис. 77. Плотностное распределение рибосомных частиц по мере их разборки (потери белка) в результате инкубации в CsCl (по A. S. Spirin et al. J. Mol. Biol., 1965, v. 14, p. 611–615):

a — рибосомы, фиксированы формальдегидом и центрифугированы в CsCl до равновесия; единственный компонент $\rho = 1,64$ г/см³ соответствует исходным рибосомам; *б* — рибосомы инкубированы в 5 М CsCl в течение 15 мин, затем фиксированы формальдегидом и центрифугированы в CsCl до равновесия; видно появление белок-дефицитных частиц с $\rho = 1,68–1,69$ г/см³; *в* — рибосомы инкубированы в 5 М CsCl в течение 1 ч, затем фиксированы формальдегидом и центрифугированы в CsCl до равновесия, видно накопление белок-дефицитных частиц и появление частиц, еще более дефицитных по белку, $\rho = 1,72–1,74$ г/см³; *г* — рибосомы центрифугированы в CsCl без фиксации в течение 36 ч; основным компонентом становятся частицы, сильно дефицитные по белку, $\rho = 1,72–1,74$ г/см³.

Отщепление «сердцевинных» РНК-связывающих белков, однако, уже более существенно сказывается на дестабилизации РНК, так что ее компактность, согласно измерениям радиуса инерции, несколько уменьшается (линейные размеры возрастают приблизительно на одну четверть). Тем не менее, и изолированная 16S РНК при достаточной концентрации Mg^{2+} и ионной силе, и 16S РНК в комплексе с «самым сердцевинным» белком S4, и комплекс РНК с четырьмя белками, такими как S4, S7, S8 и S15, достаточно компактны и сохраняют специфическую общую укладку, проявляющуюся в характерной Y-образной форме, вписывающейся в контуры 30S субчастицы (см. Б.П., 4). Это значит, что общий тип сворачивания 16S РНК управляется и поддерживается ее собственными внутримолекулярными взаимодействиями, хотя стабилизация окончательной и полной свернутости тре-

бует набора «сердцевинных» РНК-связывающих белков.

Разумеется, другие рибосомные белки также могут вносить вклад в поддержание и стабилизацию рибосомной РНК, но, по-видимому, главным образом ее более локальных структур.

Аналогичные закономерности можно отметить и при разведении 50S субчастицы *E. coli*. Ее 23S РНК сохраняет исходную компактность

МОРФОЛОГИЯ	КОЭФФИЦИЕНТ СЕДИМЕНТАЦИИ (В УСЛОВИЯХ КОМПАКТИЗАЦИИ)	ОТЩЕПЛЯЕМЫЕ БЕЛКИ	СОДЕР- ЖАНИЕ БЕЛКА, %	ПЛАВУЧАЯ ПЛОТНОСТЬ В CsCl, г/см ³
	30S СУБЪЕДИНИЦА		38	1,62
↓		S1, S2, S3, S14, S21		
	28S РНП		30	1,67
↓		S5, S9, S10, S12, S13, S20		
	25S РНП		20	1,74
↓		S6, S18, S11, S19		
	25S РНП		15	1,76
↓		S16, S17		
	23S РНП		12	1,78
↓		S7, S8, S15		
	22S РНП		4	≈ 1,8
↓		S4		
	22S РНК		0	≈ 1,9

Рис. 78. Схема разборки рибосомной 30S субчастицы под действием высоких концентраций соли (например, повышающейся концентрации LiCl в присутствии 5 мМ MgCl₂)

вплоть до стадии, когда в частице удерживается всего 9 белков из 32 (L2, L3, L4, L13, L17, L20, L21, L22 и L23). При дальнейшем отщеплении белков компактность несколько уменьшается, но еще остается довольно высокой, а общая форма молекулы заметно не изменяется.

Таким образом, ступенчатое раздевание (разборка) рибосомных частиц ясно демонстрирует каркасную роль высокополимерной РНК для размещения рибосомных белков. Из явления разворачивания следовало, что цепь РНК (ее первичная структура) служит в качестве ковалентно-непрерывного остова частицы, объединяющего все белки. Явление разборки с сохранением основной компактности и формы РНК говорит о том, что третичная структура РНК формирует также и пространственный каркас для трехмерного расположения рибосомных белков.

Самосборка

Разборка обратима, и в соответствующих ионных условиях происходит обратная сборка рибосомных частиц с восстановлением их функциональных активностей. Реконструкция рибосомных частиц, как 30S, так и 50S, может быть осуществлена из изолированных рибосомных РНК и полного набора индивидуальных рибосомных белков.

Условиями для самосборки служат: умеренная ионная сила (ниже 0,5), достаточная концентрация Mg^{2+} (от 10 до 30 мМ) и повышенная температура. М. Номура с сотр., осуществившие полную реконструкцию биологически активных 30S субчастиц *E. coli* из индивидуальных РНК и белка, использовали 0,3–0,33 М KCl с 20 мМ $MgCl_2$, инкубируя смесь при 40°C в течение 20 мин. Они нашли, что оптимальной является ионная сила около 0,4. Очевидно, более высокие ионные силы подавляют взаимодействия белков с РНК, а при более низких ионных силах возрастает вклад конкурирующих неспецифических взаимодействий основных белков с отрицательно заряженным полинуклеотидом. Относительно высокая концентрация Mg^{2+} необходима, по-видимому, прежде всего для поддержания третичной и вторичной структуры РНК, служащей каркасом для размещения белков. Вообще, следует отметить, что так называемый «буфер для реконструкции» Номура служит в то же время средой, в которой рибосомная РНК достаточно компактна в изолированном состоянии и поддерживает свою специфическую форму. Повышенная температура оказывается также очень важной для реконструкции и требуется, как считают, для облегчения структурной перестройки промежуточного рибонуклеопротеидного комплекса от менее компактной к более компактной конформации.

Довольно естественно, что в ходе самосборки первыми белками, которые присоединяются к рибосомной РНК из смеси, должны быть независимые РНК-связывающие «сердцевинные» белки. В случае 30S субчастицы *E. coli* это белки S4, S7, S8, S15, S17 и S20 (см. Б. III.5). Вместе с ними присоединяется также белок S16. Присоединение шести белков, а именно S4, S7, S8, S15, S16 и S17 (стадия I, рис. 79), оказывается достаточным, чтобы произошел переход промежуточного рибонуклеопротеида из менее компактного в более компактное состояние (стадия II, рис. 79). По-видимому, именно этот переход требует повышен-

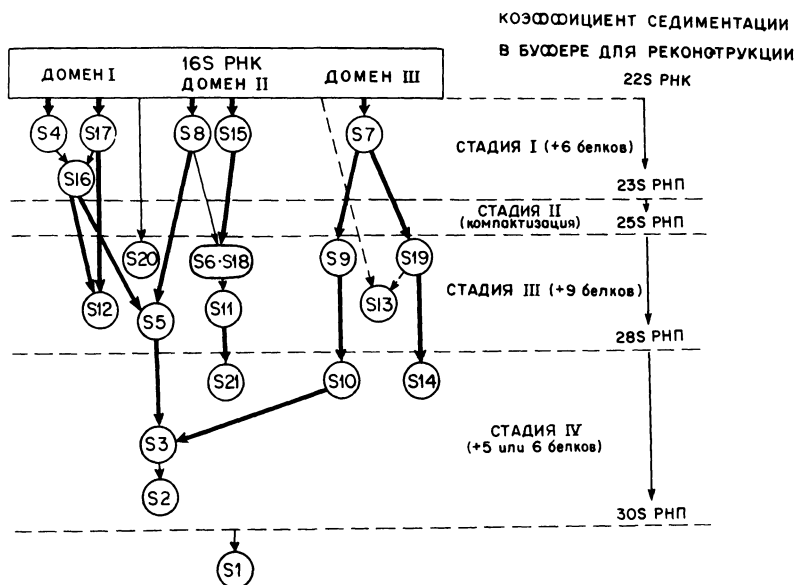


Рис. 79. Схема самосборки рибосомной 30S субчастицы из 16S РНК и 21 белка («карта сборки») (составлена на основании данных М. Номура и сотр.: P Traub, M. Nomura, J. Mol. Biol., 1969, v. 40, p. 391-413; W. A. Held, M. Nomura, Biochemistry, 1973, v. 12, p. 3273-3281; S. Mizushima, M. Nomura, Nature, 1970, v. 226, p. 1214-1218; W. A. Held et al., J Biol Chem., 1974, v. 249, p. 3103-3111).

жирные стрелки — сильная зависимость связывания белка от РНК; тонкие стрелки — слабая зависимость (см. подпись к рис. 60); в целях большей ясности и простоты многие слабые зависимости между белками опущены

ной температуры в процессе сборки. В результате перехода 16S РНК практически достигает максимальной компактности своей общей укладки, свойственной ей в составе конечной 30S субчастицы (см. Б.П.4).

Одновременно с вышеуказанными белками, еще до перехода в более компактное состояние, к 16S РНК и к образуемому комплексу могут присоединяться белки S20, S6-S18, S5, S9, S11, S12, S13 и S19. Тем не менее на рис. 79, дающем схему последовательности и взаимозависимости присоединения белков в процессе реконструкции 30S субчастицы *E. coli*, их включение в рибонуклеопротеид представлено как стадия III самосборки, так как они, даже если присоединены, не строго обязательны для компактизации, и могут присоединяться также и после нее. Кроме того, как видно из схемы, большинство белков, присоединяющихся на этом этапе самосборки, зависит от присутствия предыдущего набора белков. Так, связывание белков S9 и S19 определяется присутствием белка S7 на РНК. Присоединение белков S6-S18 требует присутствия белка S15, а также, по-видимому, в меньшей мере белка S8. В свою очередь, белок S11 зависит от белков S6-S18. Присоединение белка S5 наводится белками S8 и S16. (Еще раз следует подчеркнуть, что

стадии II и III, указанные на схеме самосборки, на самом деле, вероятно, не разделены последовательно, а проходят одновременно, т. е. компактизация и присоединение 9 белков не очень зависят друг от друга и могут идти параллельно; стадия II может быть проведена *in vitro* также и после стадии III.)

Только после компактизации рибонуклеопroteида к комплексу присоединяется последний набор белков, а именно S3, S10, S14, S21, а также S2 и S1 (стадия IV на рис. 79), формируя окончательную биологически активную 30S субчастицу. Кроме необходимости окончательной общей укладки 16S РНК, включение каждого из этих белков требует присутствия белков, присоединившихся на предыдущем этапе. Для связывания белка S10 необходим белок S9, присоединение белка S14 определяется белком S19, белок S3 может включиться только при наличии белков S5 и S10, а белок S21 очень зависит от белка S11. На присоединение белка S2 влияет белок S3, а также, по-видимому, локальная структура рибонуклеопroteида. Самый крупный кислый белок S1 также требует правильной укладки рибонуклеопroteида, и оказалось трудным определить, какие конкретные белки ответственны за его включение.

Из рассмотрения всей схемы реконструкции 30S субчастицы видно, что сборка каждой структурной доли идет более или менее независимо на соответствующем домене 16S РНК. Так, на 5'-концевом домене I собираются белки S4, S16, S17, S20, а также S12, формируя тело субчастицы. Серединный домен II присоединяет белки S8, S15, S6–S18, а также S11 и S21, давая в результате собранную боковую лопасть частицы. 3'-проксимальный домен III с белком S7 включает белки S9, S13 и S19, а затем белки S10 и S14, формируя головку 30S частицы. В то же время, необходимо отметить также междоменные и междолевые взаимодействия. Наиболее характерным является присоединение белка S5, определяемого одновременно доменами I и II и их белками, и белка S3, зависящего от всех трех доменов РНК и их белков. Очень вероятно, что белок S5 занимает место где-то на границе тела субчастицы с ее боковой лопастью, в то время как белок S3 располагается на стыке головки, тела и боковой лопасти 30S субчастицы. (Согласно данным по самосборке и по химическим сшивкам, не приведенным здесь, белок головки S13 также, возможно, непосредственно примыкает к двум другим долям субчастицы.)

Аналогичный анализ самосборки 50S субчастицы *E. coli* из 23S РНК, 5S РНК и 32 белков с выявлением взаимозависимости белков и выделением последовательных этапов также может быть сделан на основании совокупности экспериментальных данных. Все принципиальные закономерности сборки для обеих субчастиц оказались общими.

Имеются все основания полагать, что процесс сборки рибосом *in vivo* протекает в основном по тому же пути, что показан при реконструкции частиц *in vitro*.

Рекомендуемая литература

- Молекулы и клетки: Пер. с англ./Под ред. Г. М. Франка. М.: Мир, 1970. С. 80–92.
Спирин А. С. Рибонуклеиновые кислоты (состав, строение и биологическая роль). XIX Баховские чтения, М.: Наука, 1964.
Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М.: Наука, 1971.

Сердюк И. Н., Агаларов С. Ч., Гонгадзе Г. М. и др. О форме и компактности рибосомных РНК и их комплексов с белками в растворе. — Молекул. биол., 1984. Т. 18. С. 244—261.

Спирин А. С., Киселев Н. А., Шакулов Р. С., Богданов А. А. Изучение структуры рибосом: обратимое разворачивание рибосомных частиц в рибонуклеопротеидные тяжи и модель укладки. — Биохимия, 1963. Т. 28, № 5. С. 920—930.

Спирин А. С., Лерман М. И., Гаврилова Л. П., Белицина Н. В. Реконструкция биологически активных рибосом из обедненных белком рибонуклеопротеидных частиц и рибосомного белка. — Биохимия, 1966. Т. 31. С. 424—429.

Chambliss G. et al., eds. Ribosomes: Structure, Function, and Genetics. — Baltimore: Univ. Park Press, 1979, p. 267—294.

Chao F. C. Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast. — Arch. Biochem. Biophys., 1957, v. 70, p. 426—431.

Gavrilova L. P., Ivanov D. A., Spirin A. S. Studies on the structure of ribosomes: III. Stepwise unfolding of 50S particles without loss of protein. — J. Mol. Biol., 1966, v. 16, p. 473—489.

Gesteland R. F. Unfolding of *Escherichia coli* ribosomes by removal of magnesium. — J. Mol. Biol., 1966, v. 18, p. 356—371.

Held W. A., Ballon B., Mizushima S., Nomura M. Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. — J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 3103—3111.

Hosokawa K., Fujimura R., Nomura M. Reconstitution of functioning active ribosomes from inactive subparticles and proteins. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1966, v. 55, p. 198—204.

Lerman M. I., Spirin A. S., Gavrilova L. P., Golov V. F. Studies on the structure of ribosomes. II. Stepwise dissociation of protein from ribosomes by caesium chloride and re-assembly of ribosomelike particles. — J. Mol. Biol., 1966, v. 15, p. 268—281.

Mizushima S., Nomura M. Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. — Nature, 1970, v. 226, p. 1214—1218.

Nomura M., Erdmann V. Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. — Nature, 1970, v. 228, p. 744—748.

Spirin A. S. Structural transformations of ribosomes (dissociation, unfolding and disassembly). — FEBS Lett., 1974, v. 40, p. S38—S47.

Spirin A. S., Belitsina N. V. Biological activity of the re-assembled ribosome-like particles. — J. Mol. Biol., 1966, v. 15, p. 282—283.

Staehelin T., Meselson M. *In vitro* recovery of ribosomes and of synthetic activity from synthetically inactive ribosomal subunits. — J. Mol. Biol., 1966, v. 16, p. 245—249.

Tissières A., Watson J. D. Ribonucleoprotein particles from *E. coli*. — Nature, 1958, v. 182, p. 778—780.

Traub P., Nomura M. Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. — Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1968, v. 59, p. 777—784.

Vasiliev V. D., Koteliansky V. E. The 30S ribosomal subparticle retains its main morphological features after removal of half the proteins. — FEBS Lett., 1977, v. 76, p. 125—128.