

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Исключение* влияния нестабильности мощности лазера на точность регистрации спектров комбинационного рассеяния света биополимеров / Д. Н. Говорун, И. В. Кондратюк, Я. Р. Мищук, Н. В. Желтовский // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 4.— С. 105—107.
2. *Говорун Д. Н., Мищук Я. Р., Желтовский Н. В.* Магнитные дефокусирующие насадки для повышения пороговой чувствительности ФЭУ // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 5.— С. 46—48.
3. *Говорун Д. Н., Коротков П. А., Фомин В. М.* Устройство управления разверткой спектрометра ДФС-24 / АН УССР. Ин-т молекуляр. биологии и генетики.— Киев, 1987.— 7 с.— Деп. в УкрНИИТИ 01.10.87, № 2787-Ук87.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 23.02.90

УДК 547.963.3

© В. И. Баранов, Д. Э. Гулямова, Т. Н. Цалкова, И. Н. Сердюк, 1990

ИЗУЧЕНИЕ ТРАНСЛИРУЮЩИХ ГИБРИДНЫХ ИЗОТОПНЫХ РИБОСОМНЫХ ЧАСТИЦ МЕТОДОМ НЕЙТРОННОГО РАССЕЯНИЯ

Методом нейтронного рассеяния исследованы препараты транслирующих гибридных изотопных 70S рибосомных частиц: (H)-30S(D)-50S, (D)-30S*(H)-50S, ((D)-РНК-(H)-белок)-30S*(D)-50S. Показано, что изменение компактности рибосомы при транслокации происходит, в основном, в малой, а не в большой субчастице рибосомы.*

Введение. Процесс трансляции (элонгации) состоит из повторяющихся циклов, каждый из которых имеет три следующие друг за другом стадии: кодон-зависимого связывания аминоктил-тРНК, транспептидации и транслокации. Стадия транслокации включает в себя значительные внутририбосомные перемещения матрицы и продуктов реакции транспептидации: освобождение деацелированной тРНК и переход пептидил-тРНК из одного участка в другой. Возникает вопрос: сопровождается ли стадия транслокации изменениями самой рибосомы или же она является жесткой ориентирующей подложкой для компонентов аппарата трансляции? Впервые возможность динамических изменений в элонгационном цикле была отмечена Липманом [1, 2]. В наиболее четкой форме этот вопрос сформулирован в 1968 году, когда была выдвинута модель о некотором размыкании двух ассоциированных рибосомных субчастиц как возможном приводном механизме транслокации [3—5]. Модель предсказывает, что транслирующие рибосомы в двух функциональных состояниях должны иметь разную компактность, а именно: рибосомы в посттранслокационном состоянии должны быть менее компактны, чем в претранслокационном.

Исследование транслирующих рибосом методом нейтронного рассеяния, описанное в работах [6, 7], показало, что процесс транслокации сопровождается изменением компактности целой рибосомной частицы с амплитудой в несколько десятых нанометра.

Возникает вопрос о том, происходит ли наблюдаемое изменение за счет изменения расположения рибосомных субчастиц друг относительно друга или оно сосредоточено в одной из субчастиц, и если это так, то в какой именно?

Для решения этой проблемы были сконструированы три типа (70S) рибосомных частиц. В первых двух типах рибосомных частиц были дейтерированы либо малая (30S), либо большая (50S) субчастицы. В третьем типе рибосомных частиц 30S субчастица была реконструирована из дейтерированной 16S РНК и обычных (протонированных) белков.

Транслирующие рибосомы, полученные колоночной техникой из следующих гибридных изотопных рибосомных частиц: (H)-30S*(D)-50S, (D)-30S*(H)-50S и ((D)-РНК·(H)-белок)-30S*(D)-50S, были исследованы методом нейтронного рассеяния в пре- и посттранслокационном состояниях. Каждая из частиц была исследована в условиях, при которых основной вклад в рассеяние вносит либо протонированный, либо дейтерированный компонент рибосомы.

Материалы и методы. Бактерии *Escherichia coli* MRE-600 выращивали в условиях жидкой культуры на среде, содержащей H-глюкозу в качестве источника углерода. Рост проводили параллельно на H₂O и 79 % D₂O.

70S рибосомы были получены, как описано ранее [8], но с использованием двукратной промывки 1 М NH₄Cl.

Рибосомные 30S и 50S субчастицы разделяли зональным центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы (7—45 %) в буфере (0,01 М трис-HCl, pH 7,4), содержащем 0,001 М MgCl₂ и 0,1 М NH₄Cl, в зональном роторе В-XIV.

30S субчастицы реконструировали из препарата тотального протонированного белка и дейтерированной 16S РНК [9].

Препарат 16S РНК получали методом фенольной депротенинизации [9]; препарат тотального белка — обработкой 30S субчастиц 2 М LiCl в присутствии 4 М мочевины [10].

Протонированные (H) и дейтерированные (D) субчастицы смешивали в эквимольном соотношении для получения следующего набора 70S рибосом: (H)-30S*(D)-50S, (D)-30S*(H)-50S, ((D)-РНК·(H)-белок)-30S*(D)-50S. Из перечисленных типов 70S рибосом выделяли препараты транслирующих рибосом. Получение и подготовку последних к измерениям в нейтронном рассеянии проводили, в основном, согласно процедуре, описанной в [1]. При получении претранслокационных рибосом через колонку пропускали (D)-тРНК, аминоацелированную фенилаланином. В результате в исследуемых препаратах в Р-участке рибосом всегда находилась либо (H)-тРНК, либо пептидил-(H)-тРНК, а в А-участке претранслокационных рибосом — пептидил-(D)-тРНК.

Нейтронные измерения проводили в малоугловой камере D-II нейтронного реактора в Гренобле (Франция) в условиях, описанных ранее [6].

Результаты и обсуждение. Общая нейтронная характеристика гибридных изотопных рибосомных частиц. Зависимость корня квадратного из нормализованной интенсивности нейтронного рассеяния препаратами транслирующих рибосом, разделенной на концентрацию рибосом в препарате, пропускание и толщину кюветы, от доли D₂O в смеси H₂O—D₂O представлена на рис. 1 для четырех комбинаций H и D рибосомных субчастиц. При этом величина интенсивности рассеяния экстраполирована к нулевому вектору рассеяния Q. Как видно из рис. 1, эти зависимости представляют прямые, параллельные друг другу. Отсюда следует, что объем рибосомной частицы не изменяется при дейтерировании. Прямые линии пересекают ось абсцисс в следующих точках: в случае (H)-30S*(H)-50S рибосом — в точке, соответствующей 59,5 % D₂O; в случае (D)-30S*(H)-50S рибосом — 71 % D₂O; в случае (H)-30S*(D)-50S рибосом 81,0 % D₂O; и в случае (D)-30S*(D)-50S рибосом — 91 % D₂O. Прямая линия для изолированной (D)-50S-субчастицы, представленная на этом же рисунке, пересекает ось абсцисс в точке, соответствующей 90,5 % D₂O.

При подготовке препаратов транслирующих рибосом к нейтронным измерениям особое внимание было обращено на выделение пика моносом из глицеринового градиента. Такая процедура оказалась весьма эффективной для всех типов частиц, за исключением (H)-30S*(D)-50S рибосом. Все попытки получить эту частицу в неагрегированном состоянии окончились неудачей. Поэтому результаты измерений (H)-30S*(D)-50S рибосом в работе не приводятся, а для определения изменения радиуса инерции малой 30S субчастицы 70S рибосом использован следующий подход: неагрегирующая частица (D)-30S*(H)-

50S была измерена при двух контрастах: 59 % D₂O, когда «невидима» (H)-50S субчастица 70S рибосом, и 91 % D₂O, когда «невидима» 30S субчастица 70S рибосом. Результаты этих измерений в виде графика Гинье представлены на рис. 2. Там же приведены результаты измерений ((D)-РНК·(H)-белок)-30S*(D)-50S частицы в 96 % D₂O. Как видно из приведенных графиков, Гинье-зависимости представляют собой хорошие прямые линии. Данные по вычислению нейтронных радиусов инерции представлены в таблице, откуда видно, что в условиях высокого контраста для 30S рибосомной субчастицы или ее белкового компонента радиус инерции рибосомы в посттранслокационном состоянии

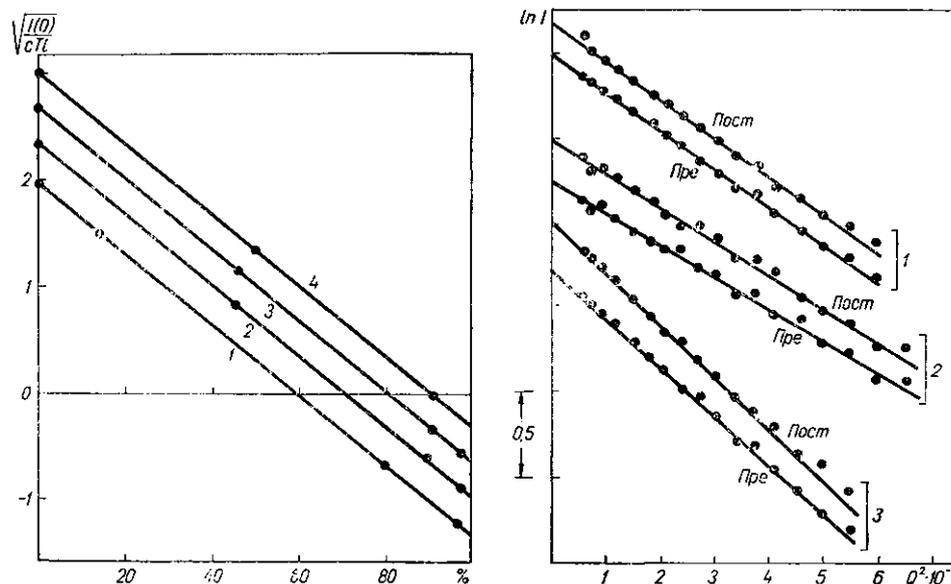


Рис. 1. Зависимость корня квадратного из интенсивности нейтронного рассеяния, деленная на концентрацию (c), пропускание образца (T) и толщину кюветы (l), от доли D₂O (в %) в смеси H₂O—D₂O для четырех типов гибридных изотопных 70S рибосомных частиц: 1—(H)-30S*(H)-50S; 2—(D)-30S*(H)-50S; 3—(H)-30S*(D)-50S; 4—(D)-30S*(D)-50S

Fig. 1. The dependence of square root of neutron scattering intensity divided by concentration—(c), transmission—(T) and thickness—(l) on D₂O fraction (in %) for four types of hybrid-isotope 70S ribosomal particles: 1—(H)-30S*(H)-50S, 2—(D)-30S*(H)-50S, 3—(H)-30S*(D)-50S, 4—(D)-30S*(D)-50S.

Рис. 2. Зависимость интенсивности нейтронного рассеяния от вектора рассеяния Q ($Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\Theta}{2}$), где λ —длина волны падающих нейтронов, Θ —угол рассеяния) в координатах Гинье ($\ln I$ от Q^2) для трех типов гибридных изотопных 70S рибосомных частиц в пре- и посттранслокационном состоянии: 1—(D)-30S*(H)-50S в 91% D₂O; 2—(D)-30S*(H)-50S в 59% D₂O; 3—((D)-РНК·(H)-белок)-30S*(D)-50S в 96% D₂O

Fig. 2. The Guinier plots of neutron scattering intensity ($\ln I$ on Q^2) for three types of hybrid-isotope 70S ribosomal particles in pre-translocation and post-translocation states; 1—(D)-30S*(H)-50S in 91 % D₂O, 2—(D)-30S*(H)-50S in 59 % D₂O, 3—((D)-RNA·(H)-protein)-30S*(D)-50S in 96 % D₂O ($Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\Theta}{2}$, where λ —a wavelength of incident neutrons, Θ —a scattering angle).

больше такового в претранслокационном состоянии. Напротив, в условиях высокого контраста для 50S рибосомной субчастицы радиус инерции рибосомы в посттранслокационном состоянии совпадает с таковым в претранслокационном состоянии. В то же время интенсивность рассеяния в нулевом угле, деленная на концентрацию, совпадает для обоих состояний во всех случаях.

Радиусы инерции гибридных изотопных 70S рибосом в пре- и посттранслокационном состоянии, измеренные нейтронным рассеянием

Radii of gyration of the hybrid-isotope 70S ribosomes in pre-translocation and post-translocation states as measured by neutron scattering

70S рибосомная частица	Доля D ₂ O в среде рассеяния, %	Компонент 70S рибосомы, видимый в рассеянии	Радиус инерции, нм		Интенсивность рассеяния, экстраполированная на нулевой угол и деленная на концентрацию	
			Пре	Пост	Пре	Пост
(D)-30S*(H)-50S	91	Большая субчастица	8,76±0,06	8,82±0,07	2,03±0,02	2,00±0,02
(D)-30S*(H)-50S	59	Малая субчастица	7,25±0,02	7,72±0,15	1,29±0,04	1,21±0,05
((D)-РНК·(H)-белок)-30S*(D)-50S	96	Белковый компонент малой субчастицы	9,37±0,06	9,64±0,06	1,00±0,02	0,97±0,02

Примечание. Точка компенсации дейтерированного компонента ((D)-РНК·(H)-белок)-30S*(D)-50S соответствует 94 % D₂O.

Из этих фактов мы заключаем, что при транслокации изменение компактности рибосомы происходит, в основном, в малой, а не большой субчастице рибосомы. Вопрос о межсубчастичном движении остается открытым. Его решение требует дополнительных экспериментальных исследований.

За многочисленные и плодотворные обсуждения и стимулирующий интерес к данной работе авторы выражают благодарность А. С. Спирина, а также за помощь, оказанную при выполнении работы, — И. Н. Рублевской, Т. Я. Панкратовой, И. Н. Брезгуновой, Н. Г. Коровянскому.

NEUTRON SCATTERING INVESTIGATIONS OF TRANSLATING HYBRID ISOTOPE RIBOSOMAL PARTICLES

V. I. Baranov, D. E. Gulyamova, T. N. Tsalkova, I. N. Serdyuk

Institute of Protein, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region

Summary

Three types of translating hybrid-isotope 70S ribosomal particles: (H)-30S*(D)-50S, (D)-30S*(H)-50S, ((D)-RNA·(H)-protein)-30S*(D)-50S have been investigated by the neutron-scattering method. It is shown that small subparticle rather than large one is primarily responsible for alteration in compactness of the 70S ribosome observed during translocation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Conway T. W., Lipman F. Characterization of ribosome-linked guanosinetriphosphates in *Escherichia coli* extracts // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1964.— 52, N 6.— P. 1462—1469.
2. Nishizuka Y., Lipman F. The interrelation between guanosine triphosphates and amino acid polymerization // Arch. Biochem. and Biophys.— 1966.— 116, N 1—3.— P. 344—351.
3. Спири А. С. О механизме работы рибосомы. Гипотеза смыкания — размыкания субчастиц // Докл. АН СССР.— 1969.— 179, № 6.— С. 1467—1470.
4. Spirin A. S. A model of the functioning ribosome: locking and unlocking of the ribosome subparticles // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.— 1969.— 34.— P. 197—207.

5. Spirin A. S. Energetics and dynamics of the protein-synthesizing machinery // *The Roots of modern biochemistry* / Eds H. Kleinkauf et al.— Berlin; New York: Walter de Gruyter Co., 1988.— P. 512—533.
6. *Translocation* makes the ribosome less compact / A. S. Spirin, V. I. Baranov, G. S. Potubesov et al. // *J. Mol. Biol.*— 1987.— 194, N 1.— P. 119—128.
7. Изменение компактности рибосомы при транслокации / А. С. Спирин, В. И. Баранов, И. Н. Сердюк, Р. Май // Докл. АН СССР.— 1984.— 274, № 5.— С. 1260—1266.
8. Гаврилова Л. П., Смолянинов В. В. Изучение механизма транслокации в рибосомах. I. Синтез полифенилаланина в рибосомах *E. coli* без участия гуанозин-5'-трифосфата и белковых факторов трансляции // Молекуляр. биология.— 1971.— 5, № 6.— С. 883—890.
9. Traub P., Nomura M. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes. VI. Mechanism of assembly of 30S ribosomes *in vitro* // *J. Mol. Biol.*— 1969.— 40, N 3.— P. 391—413.
10. 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. USA.*— 1969.— 59, N 3.— P. 777—784.
11. Баранов В. И. Получение транслирующих рибосом с помощью колонок, содержащих иммобилизованную полиуридиловую кислоту // Биоорг. химия.— 1983.— 9, № 12.— С. 1650—1657.

Ин-т белка АН СССР, Пущино

Получено 10.04.90

УДК 577.352.4

© С. А. Пилецкий, И. Я. Дубей, Д. М. Федоряк, В. П. Кухарь, 1990

СУБСТРАТ-СЕЛЕКТИВНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МЕМБРАНЫ. ИЗБИРАТЕЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Предложен метод синтеза полимерных мембран на основе сильносшитого диэтиламиноэтилметакрилата, обладающих избирательной проницаемостью для отдельных нуклеозидмонофосфатов. Изучены закономерности формирования селективной пористой структуры. Обсуждается возможный механизм переноса ионов. Метод может быть использован в области мембранного катализа, для разделения сложных смесей близких по свойствам компонентов, а также для формирования биосенсорных систем.

Введение. Быстрое развитие биоорганической химии клеточных мембран обусловило прогресс в познании таких их важнейших функций, как транспорт различных метаболитов, генерация энергии, взаимодействие клеток и их деление, передача нервного возбуждения, рецепция сигналов внешней среды и т. п.

Значительный успех в моделировании рецепторной функции мембран был достигнут при конструировании матричных полимеров. Данный метод основан на получении сильносшитого полимера в присутствии матричных молекул, впоследствии удаляющихся из него с освобождением каверн, структура которых обеспечивает селективное «узнавание» этих молекул (рис. 1). С помощью данного метода были синтезированы полимеры с высокой селективностью к сахарам [1], производным аминокислот [2], дезоксирибонуклеозидам [3], что свидетельствует о его широких практических возможностях.

По нашему предположению, матричные молекулы принимают участие в формировании всей системы пор полимера. В результате нековалентного взаимодействия матрицы с мономером и последующей полимеризации образуется система пор с диаметром, близким в некоторых местах к диаметру матричных молекул, вокруг которых происходит процесс образования полимера. Мембрана из такого полимера должна быть проницаема только для молекул, размер которых не превышает диаметра матрицы.

Для проверки настоящей гипотезы нами синтезирован ряд полимеров, селективных для дезоксиаденозина (dA), *L*-фенилаланина (*L*-Phe) и аденозинмонофосфорной кислоты (AMP). Селективность полученных полимеров исследовали электрофоретическим методом.