

19-98-115

На правах рукописи
УДК 577.32

Ф-21

ФАН
Ликсин

СТРУКТУРНАЯ МОДЕЛЬ
30S РИБОСОМНОЙ СУБЧАСТИЦЫ
THERMUS THERMOPHILUS
С ПРОСТРАНСТВЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ 35Å
ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ

Специальность: 03.00.02 — биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Работа выполнена в Лаборатории Нейтронной Физики им. И.М.Франка Объединенного Института Ядерных Исследований (г. Дубна) и Институте белка РАН (г. Пушино).

Научный руководитель: Доктор физико-математических наук,
профессор И.Н.Сердюк

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор,
Л.А.Фейгин
кандидат физико-математических наук
А. А. Вазина

Ведущая организация: Институт математических проблем биологии РАН, г. Пушино

Защита состоится "___" _____ 1998 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 200.22.01 в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН по адресу: 142292, г. Пушино, Московской обл., ИТЭБ РАН

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИТЭБ РАН

Автореферат разослан "___" _____ 1998 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

П. А. Нелипович

Актуальность темы Создание пространственной модели рибосомы высокого разрешения и адекватное структурное описание механизма биосинтеза белка невозможны без четкого разграничения РНК-ого и белкового компонентов в структуре рибосомы. Последние достижения в криоэлектронной микроскопии позволили восстановить изображение 70S рибосомы *E.coli* с разрешением 20-30Å. Однако этот метод не подходит для подобного разграничения, поскольку электронные плотности РНКого и белкового компонент мало различаются. Одним из возможных путей получения структуры рибосом с высоким разрешением является расшифровка дифракционных картин кристаллов рибосом, что до сих пор не сделано из-за отсутствия алгоритма решения фазовой проблемы для такого крупного комплекса. Одним из необходимых условий решения фазовой проблемы по нашему мнению является наличие надежных структурных моделей рибосомы и ее РНК. Эти модели могут быть получены с помощью малоуглового рассеяния нейтронов с использованием метода вариации контраста. Недавно был предложен прямой метод интерпретации кривых малоуглового рассеяния с помощью сферических гармоник. Основное достоинство этого подхода состоит в возможности прямой визуализации положения РНК в рибосомных частицах без использования априорной информации. Эта новая возможность малоуглового рассеяния уже сегодня может обеспечить пространственное разрешение, достаточное для построения надежных физических моделей больших биологических макромолекулярных ансамблей, к которой относится рибосома. До недавнего времени эти модели в основном строились для *E.coli*. Однако за последнее время наибольший интерес проявляется к исследованиям структуры другой бактерии *Thermus thermophilus*. Этот интерес вызван двумя обстоятельствами: во-первых рибосомные частицы из этой бактерии более легко кристаллизуются и во-вторых структура многих рибосомных белков из этой бактерии уже сегодня известна в атомном разрешении. Это делает задачу построения структурной модели рибосом *Thermus thermophilus* весьма актуальной. Такая модель в недалеком будущем может служить основой для локализации отдельных белков.

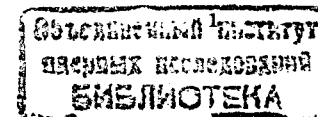
Научная новизна Впервые получена структурная модель 30S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* и ее РНК с пространственным разрешением 35 Å по данным малоуглового рассеяния нейтронов методом сферических гармоник.

При сравнении полученной модели с аналогичной моделью для *E.coli* показано, что контуры РНКого компонента полностью совпадают в обеих субчастицах, тогда как контуры белкового компонента несколько отличаются.

В рамках МУРН впервые предложен простой метод определения доли включения дейтерия в необмениваемые позиции РНКого и белкового компонентов в рибосоме. Метод имеет сравнимую с методом ЯМР точность ($\approx 2\%$), однако в отличие от последнего не требует разделения двух компонентной частицы на отдельные составляющие.

Методом биосинтетического дейтерирования получены два типа 30S субчастица рибосом *Thermus thermophilus*, идентичных по структуре, но с существенно разным вкладом в рассеяние от РНКого и белкового компонента.

Научная значимость работы Предложена структура 30S субчастица рибосом *Thermus thermophilus* с пространственным разрешением 35Å на основе данных малоуглового рассеяния нейтронов. Эта структурная модель может использоваться в будущем для увеличения пространственного разрешения на основании данных



рентгеновской дифракции отдельных элементов, составляющих этой частицы, например, рибосомных белков.

Апробация работы и публикации Материалы диссертации докладывались на международной конференции "1st European Conference on Neutron Scattering" (Interlaken, Switzerland, 8-11 Окт. 1996); "7th Berlin Neutron Scattering Centre user's meeting" (Berlin, 8-10 ноября, 1996); международной школе "HERCULES-97 (Higher European Research Course for User of Large Experimental Systems), Neutron and Synchrotron Radiation for Biomolecular Structure and Dynamics" (Grenoble, France, 16 фев.-27 марта, 1997); "IV International School on Neutron Scattering around SINQ" (Zuoz, Switzerland, 18-24 авг., 1996); "I конференции молодых ученых ОИЯИ" (Дубна, марта 1997), "II конференции молодых ученых ОИЯИ" (Дубна, марта 1998) и опубликованы в 6 работах.

Цель и задачи исследования Цель настоящей диссертационной работы состоит в том, чтобы построить структурную модель 30S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* с максимально возможным пространственным разрешением по данным малоуглового рассеяния нейтронов с помощью метода сферических гармоник. Работа включает решение следующих конкретных задач: разработку метода определения доли включения дейтерия в различные компоненты рибосомы методом малоуглового рассеяния нейтронов; получение рибосомных частиц с разным включением дейтерия в различные компоненты рибосомы методом биосинтетического дейтерирования; набор экспериментальных кривых малоуглового рассеяния нейтронов для 30S субчастицы разной степени дейтерирования; интерпретацию данных малоуглового рассеяния нейтронов частицами и построение структурной модели 30S субчастицы.

Структура диссертации Диссертация изложена на 107 страницах, включает 26 рисунков, 6 таблиц и 63 уравнения; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения и выводов. В обзоре литературы представлены общие принципы малоуглового рассеяния нейтронов, методы вариации контраста, методы интерпретации кривых малоуглового рассеяния нейтронов для исследования структуры рибосомы, некоторые результаты физико-химических исследований структуры рибосомной субчастицы 30S и постановка задачи диссертационной работы. В главе "Материалы и методы" описаны процедура выращивания бактерий *E.coli* и *Thermus thermophilus* и выделения рибосом и их субчастиц, установки, где проводились эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов, методики измерений кривых малоуглового рассеяния нейтронов и рентгеновских лучей и методы интерпретации этих кривых. Последняя часть диссертации посвящена результатам работы по определению доли включения дейтерия в различные компоненты рибосомы при ее биосинтетическом дейтерировании методом малоуглового рассеяния нейтронов и построению структурной модели 30S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* и их обсуждению. В конце диссертации представлены основные выводы. Список литературы содержит 110 работ.

Штамм MRE600 *Escherichia coli* был использован для определения степени включения дейтерия в различные компоненты рибосом, поскольку он характеризуется низким уровнем РНКазной активности и хорошей адаптивностью к росту на полностью дейтерированной синтетической среде.

Следующие типы рибосомных частиц из *Escherichia coli* были использованы:

(H)-70S транслирующие рибосомные частицы в пре-транслокационном состоянии. Эти частицы выделены из *E.coli*, выращенной на минимальной синтетической среде, содержащей H_2O и H -глюкозу [Spirin et al., 1987].

(HD)-70S транслирующие рибосомные частицы в пре-транслокационном состоянии. Эти частицы выделены из *E. coli*, выращенной на минимальной синтетической среде, содержащей 78% D_2O и H -глюкозу [Serdyuk et al., 1992].

(HD)-50 S рибосомные субчастицы. Эти частицы получены разделением (HD)-70S транслирующих рибосомных частиц в градиенте сахарозы [Gavrilova et al., 1976].

(H) - 70S обычные нетранслирующие рибосомные частицы. Эти частицы выделены из *E.coli*, выращенной на богатой среде.

(H)-50 S рибосомные субчастицы. Эти частицы получены разделением таких (H)-70S обычных нетранслирующих рибосомных частиц в градиенте сахарозы.

(D)-50 S рибосомные субчастицы. Эти частицы выделены из *E.coli*, выращенной на синтетической, полностью дейтерированной среде, содержащей 100% D_2O и смесь дейтерированного сукцината и дейтерированного глицерина (в соотношении 1:1). При выращивании этих частиц использовалась методика FED-batch культивирования.

Для исследования структуры рибосом *Thermus thermophilus* были выращены два типа рибосомных частиц: протонированная и полностью дейтерированная (Таблица 1). 30S рибосомные субчастицы получены центрифугированием в сахарозном градиенте [Fan et al., 1997].

Таблица 1 Два типа рибосомных частиц для нейтронных измерений

Частица	Среда роста	Элементы структуры
I	H_2O , [1H]-глицерин, [1H]-сукцинат	РНК ой и белковой компоненты частицы
II	D_2O , [2H]-глицерин, [2H]-сукцинат	форма частицы в однородном приближении

Кривые рассеяния нейтронов для разных типов рибосомных частиц из *Escherichia coli* были измерены при разных контрастах в интервале векторов рассеяния от 0,01 до 0,07 \AA^{-1} на малоугловом спектрометре D11 высокопоточного реактора Института Лауэ-Ланжевена (Гренобль) и в интервале векторов рассеяния от 0,007 до 0,12 \AA^{-1} на малоугловом спектрометре "ЮМО" импульсного реактора ИБР-2 (Дубна). Концентрация рибосомных частиц варьировалась от 0,22 мг/мл до 6 мг/мл.

Кривые рассеяния нейтронов для 30S рибосомной субчастицы из *Thermus thermophilus* были измерены в широком интервале векторов рассеяния (до $\approx 0.2 \text{\AA}^{-1}$) на трех установках. Были получены четыре набора данных. Для контроля структурной идентичности частиц проводились параллельные рентгеновские измерения. Условия всех экспериментов для измерения 30S *Thermus thermophilus* представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Экспериментальные условия для измерения 30S *Thermus thermophilus*

Инструмент	Частицы	Расстояние образец-детектор (м)	Длина волны (Å)	Контраст (%D ₂ O)	Концентрация (мг/мл)
V4 HMI, Berlin HMI(I)	30S(1)	8, 4, 2, 1.16	8.0 и 6.02	0	18.5
				20	23.2
				40	24.9
				98	15.0
V4 HMI, Berlin HMI(II)	30S(1)	8, 4, 2, 1.16	6.02	0	33.0
				35	34.1
				80	36.9
				98	37.9
D11 ILL, Grenoble	30S(1)	10, 3.6, 1.2	6.0	0	1.05 и 17.1
				32	0.3 и 17.7
				73	1.72 и 15.7
				98	1.12 и 14.8
	30S(2)	10, 3.6, 1.2	6.0	0	1.59 и 29.6
YUMO JINR, Dubna	30S(1)	10.52	4.5 - 20	0	4.0
				35	4.0
				80	4.0
				98	3.7
X33 DESY, Hamburg	30S(1)	4.2	1.5	0	4 - 20
	30S(2)				

При обработке данных все экспериментальные кривые были нормированы на интенсивность падающего пучка и чувствительность детектора, концентрацию и поглощение образца. Учет ошибок при всех операциях с экспериментальными данными осуществлялся программой SAPOKO. Максимальный диаметр 30S субчастицы был оценен по кривым рентгеновского рассеяния с помощью программы ORTOGNOM, использующей разложение по полиномам Эрмита. Рассеяние в нулевой угол и радиус инерции определялись из приближения Гинье и с помощью программы косвенного преобразовании GNOM. GNOM также был использован для удаления влияния агрегации и масштабирования наборов нейтронных данных, снятых для одной и той же частицы при различных аппаратурных условиях.

Для интерпретации кривых рассеяния 30S субчастицами рибосом *Thermus thermophilus* был использован прямой метод с помощью сферических гармоник. Известно, что 30S субчастица рибосомы состоит из двух компонентов с разным химическим составом (а именно, РНК и совокупности белков). Ее интенсивность рассеяния как функция контраста записывается в виде

$$I(s, \Delta\rho) = \Delta\rho_{rna}^2 I_{rna}(s) + \Delta\rho_{pro} \Delta\rho_{rna} I_{cross}(s) + \Delta\rho_{pro}^2 I_{pro}(s) \quad (1)$$

где $\Delta\rho_{rna}$, $\Delta\rho_{pro}$, $I_{rna}(s)$ и $I_{pro}(s)$ - контрасты и интенсивности рассеяния РНК и белковым компонентом, соответственно, а $I_{cross}(s)$ - перекрестный член.

При низком разрешении структура 30S субчастицы может быть представлена с помощью двухфазной модели, описываемой функциями двух оболочек, одна из которых отвечает форме всей субчастицы, а другая - форме области в ней, занятой 16S РНК. Функцию оболочки удобно параметризовать с помощью мультипольного разложения:

$$F(\omega) \approx \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l f_{lm} Y_{lm}(\omega) \quad (2)$$

где f_{lm} - комплексные числа, а $Y_{lm}(\omega)$ - сферические гармоники. Максимальный номер гармоники L определяет разрешение описания формы, которое можно оценить величиной $(5/3)^{1/2} \pi R_g / (L+1)$, где R_g - радиус инерции частицы, а число независимых параметров составляет в общем случае $(L+1)^2 - 6$. Амплитуда рассеяния такой формой, заполненной веществом с единичной плотностью рассеяния, записывается в виде

$$A(s) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l A_{lm}(s) Y_{lm}(\omega) \quad (3)$$

где парциальные амплитуды $A_{lm}(s)$ вычисляются из степенного ряда, коэффициенты которого являются нелинейными комбинациями коэффициентов формы f_{lm} . Амплитуда рассеяния двухфазной частицей с контрастами компонентов $\Delta\rho_{rna}$ и $\Delta\rho_{pro}$ будет также описываться уравнением (5) с парциальными амплитудами

$$A_{lm}^{total}(s) = \Delta\rho_{pro} A_{lm}^{30S}(s) + (\Delta\rho_{rna} - \Delta\rho_{pro}) A_{lm}^{rna}(s) \quad (4)$$

а интенсивность рассеяния вычисляется по формуле

$$I(s, \Delta\rho) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left[A_{lm}^{total}(s) \right]^2 \quad (5)$$

Интенсивность рассеяния моделью 30S субчастицы рибосомы будет зависеть от двух наборов мультипольных коэффициентов f_{lm} , определяющих форму всей 30S субчастицы и ее 16S РНК. Алгоритм поиска структуры двухфазной частицы состоит в определении этих коэффициентов по всему набору измеренных кривых с различными контрастами компонентов из условия минимизации функционала среднеквадратичных отклонений

$$R_f^2 = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^M R_{fk}^2 = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^M \frac{\sum_j \left[(I_{exp}^{(k)}(s_j) - I_{calc}^{(k)}(s_j)) / \sigma(s_j) \right]^2}{\sum_j \left[I_{exp}^{(k)}(s_j) / \sigma(s_j) \right]^2} \quad (6)$$

где M - общее число кривых, $I_{\text{exp}}^{(k)}(s_j)$ и $\sigma^{(k)}(s_j)$ - интенсивность рассеяния в j -й экспериментальной точке k -ой кривой и ее стандартное отклонение, $I^{(k)}(s_j)$ - расчетная интенсивность рассеяния моделью. Алгоритм реализован в виде компьютерной программы MONSTER.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода определения доли включения дейтерия в различные компоненты рибосомы при ее биосинтетическом дейтерировании с помощью малоуглового рассеяния нейтронов. Главное достоинство этого метода перед стандартным методом состоит в том, что он не требует разделения частицы на два компонента. Метод основывается на двух уравнениях. Первое из них описывает зависимость интенсивности рассеяния, экстраполированной на нулевой угол $I(0)$ от контраста, а второе - аналогичную зависимость радиуса инерции. Для двухкомпонентной частицы с объемами v_1 и v_2 и плотностями амплитуд рассеяния ρ_1 и ρ_2 , соответственно можно записать

$$I(0) = (\bar{\rho}_{\text{part}} - \rho_0)^2 v^2 \quad (7)$$

где

$$\bar{\rho}_{\text{part}} = \rho_1 \frac{v_1}{v_1 + v_2} + \rho_2 \frac{v_2}{v_1 + v_2} \quad (8)$$

и

$$v = v_1 + v_2 \quad (9)$$

зависимость радиуса инерции от контраста наиболее удобно представить в виде

$$R_g^2 = x_1 R_1^2 + (1 - x_1) R_2^2 + x_1(1 - x_1) L^2 \quad (10)$$

где R_1 и R_2 есть радиусы инерции первого и второго компонентов, соответственно, а L есть расстояние между их центрами тяжести.

В формуле (10) x_1 - относительный вклад первого компонента в суммарную амплитуду рассеяния

$$x_1 = \frac{(\bar{\rho}_1 - \rho_0) v_1}{(\bar{\rho}_{\text{part}} - \rho_0)(v_1 + v_2)} \quad (11)$$

Альтернативный путь представления зависимости радиуса инерции от контраста был основан на использовании уравнения

$$R_g^2 = R_\infty^2 + \frac{\alpha}{(\bar{\rho}_{\text{part}} - \rho_0)} - \frac{\beta}{(\bar{\rho}_{\text{part}} - \rho_0)^2} \quad (12)$$

Параметры α и β характеризуют пространственное распределение плотности амплитуд рассеяния частицы, R_∞ - радиус инерции при бесконечном контрасте.

$$R_\infty^2 = R_1^2 \frac{v_1}{v_1 + v_2} + R_2^2 \frac{v_2}{v_1 + v_2} + L^2 \frac{v_1 v_2}{(v_1 + v_2)^2} \quad (13)$$

Формулы (10) и (12) строго эквивалентны.

Для случая $L=0$ (что неоднократно отмечалось для разных рибосомных частиц, изученных методом малоуглового рассеяния нейтронов) из этих формул получены следующие выражения для ρ_1 и ρ_2

$$\bar{\rho}_1 = \frac{R_g^2 - R_2^2}{R_1^2 - R_2^2} (\bar{\rho}_{\text{part}} - \rho_0) \frac{v_1 + v_2}{v_1} + \rho_0 \quad (14)$$

$$\bar{\rho}_2 = \frac{R_g^2 - R_1^2}{R_2^2 - R_1^2} (\bar{\rho}_{\text{part}} - \rho_0) \frac{v_1 + v_2}{v_2} + \rho_0 \quad (15)$$

Из формул (14) и (15) видно, что, зная экспериментальные значения плотности амплитуды рассеяния частицы ($\bar{\rho}_{\text{part}}$) и ее радиуса инерции (R_g) при данном контрасте ρ_0 , можно вычислить плотности амплитуд рассеяния каждого из компонентов в отдельности ($\bar{\rho}_1$ и $\bar{\rho}_2$). Геометрические параметры каждого из компонентов рибосомной частицы (радиусы инерции R_1 и R_2 и объемные доли $v_1/(v_1 + v_2)$) должны либо быть известны заранее, либо установлены из экспериментов по нейтронному рассеянию на обычных (протонированных) частицах. Важно подчеркнуть, что найденные таким образом параметры R_1 , R_2 и $v_1/(v_1 + v_2)$ должны быть зафиксированы и использоваться без изменений для частиц разной степени дейтерирования.

Долю дейтерия (S), встроенного в белковый и РНК-ый компоненты рибосомы в отдельности при ее выращивании *E.coli* на среде, содержащей глюкозу в качестве субстрата, можно вычислить по следующим формулам, где m - доля D_2O в среде выращивания

$$\bar{\rho}_{\text{pro}} = 1.72 + 4.71S + 0.38m + 1.22Y_{\text{pro}} \quad (16)$$

$$\bar{\rho}_{\text{RNA}} = 3.74 + 2.83S + 0.27m + 0.874Y_{\text{RNA}} \quad (17)$$

$$\rho_0 = 0.56 + 6.90Y \quad (18)$$

где Y_{pro} и Y_{RNA} есть доля D_2O , при которой плотности амплитуд рассеяния белкового и РНК-ого компонентов, соответственно, становятся равным плотностям амплитуд рассеяния растворителя ρ_0 .

Метод испытан на двух рибосомных частицах (70S и 50S) трех степеней дейтерирования, выделенных из *E. coli*, выращенной на тяжелой среде (см "Материалы и методы"). Анализ зависимости корня квадратного из нормализованной интенсивности, деленной на концентрацию, трансмиссию и толщину кюветы, от контраста для этих рибосомных частиц (Рис.1) позволяет определить их точки контрастирования: 59% D₂O для (H)-50S и (H)-70S рибосомных частиц, 91% D₂O для (HD)-50S и (HD)-70S рибосомных частиц и 123% D₂O для (D)-50S рибосомных частиц.

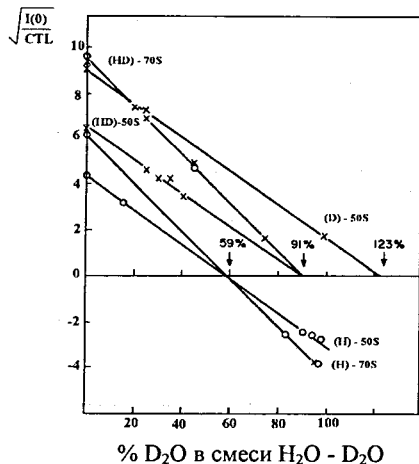


Рис.1 Зависимость $\sqrt{I(0)/CTL}$ от доли D₂O в смеси H₂O - D₂O для (H)-70S, (HD)-70S, (H)-50S, (HD)-50S и (D)-50S рибосомных частиц. (ooo - показаны данные, полученные на спектрометре D11 (Гренобль, Франция); xxx - показаны данные, полученные на спектрометре "ЮМО" (Дубна, Россия).

Анализ зависимости квадрата радиуса инерции R_g^2 от обратного контраста $1/(\bar{\rho}_{part} - \rho_0)$ для этих рибосомных частиц (Рис.2) позволяет определить их радиусы инерции при бесконечном контрасте $R_{g\infty}$ (78,5 Å для 50S рибосомной субчастицы и 91Å для 70S рибосомных частиц) и радиусы инерции РНК-ого и белкового компонентов 70S и 50S рибосомных частиц (81 и 106Å для РНК-ого и белкового компонентов 70S рибосомных частиц и 64 и 100 Å для РНК-ого и белкового компонентов 50S рибосомных частиц). Доля объема белкового компонента для 50S и 70S рибосомных частиц можно вычислена по формуле (12) и равна 0,36 и 0,37, соответственно.

В Таблице 3 представлены результаты вычисления плотности амплитуд рассеяния белкового и РНК-ого компонентов для разных типов рибосомы, найденных по формулам (14) и (15). Данные для (H)-50S и (H)-70S рибосомных частиц показывают, что разброс реальных экспериментальных данных составляет не более 1%

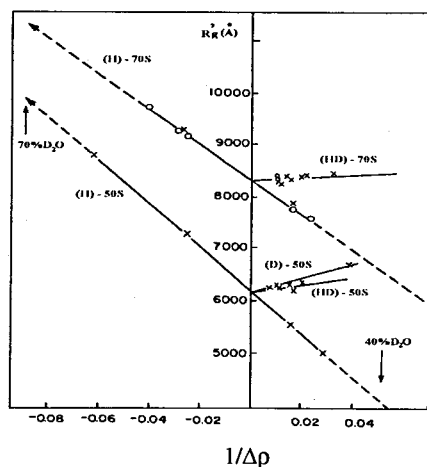


Рис. 2 Зависимость R_g^2 от обратного контраста $1/(\bar{\rho}_{part} - \rho_0)$ для (H)-70S, (HD)-70S, (H)-50S, (HD)-50S и (D)-50S рибосомных частиц. (ooo - показаны данные, полученные на спектрометре D11 (Гренобль, Франция); xxx - показаны данные, полученные на спектрометре "ЮМО" (Дубна, Россия).

от заложенных (40% и 70%, соответственно, для белкового и РНК-ого компонентов). Данные в таблице 3 для (HD)-50S и (HD)-70S рибосомных частиц подтверждают хорошо известный факт, что при выращивании *E. coli* на среде, содержащей Н-глюкозу в качестве субстрата, доля включения дейтерия в белковый компонент рибосомы всегда выше, чем в РНК-ый компонент рибосомы. Найденные в этой работе величины доли встроенного дейтерия в рибосомные частицы хорошо совпадают с данными, полученными ранее методом ЯМР (см. Рис.3). Метод имеет сравнимую с методом ЯМР точность ($\approx 2\%$), однако в отличие от последнего не требует разделения частицы на отдельные составляющие ее компоненты.

Таблица 3 Результаты вычисления плотности амплитуд рассеяния белкового и РНК-ого компонентов для разных типов рибосомы, найденных по формулам (14) и (15).

*- данные получены в Дубне.

частицы	контрасты (%D ₂ O в смеси H ₂ O - D ₂ O)	R _g (Å)	ρ	
			ρ _{pro} (%D ₂ O в смеси H ₂ O - D ₂ O)	ρ _{RNA} (%D ₂ O в смеси H ₂ O - D ₂ O)
(H)-50S	0	74.3*	39.8	69.8
	25	70.7*	39.6	69.9
	75	93.5*	39.4	69.8
	98	85.0*	39.5	70.0
			ρ(средние)	39.6
(H)-70S	0	87.9*	40.8	69.2
	16	86.8	40.8	69.2
	83	98.4	38.5	70.5
	94	96.0*	39.0	70.4
	97	95.1	41.0	69.2
		ρ(средние)	40.1	70.3
(HD)-50S	0	79.1*	95.1	88.8
	25.5	79.2*	94.5	88.2
	31.5	78.5*	90.6	90.8
	41.5	79.8*	95.3	88.2
		ρ(средние)	93.9	89.0
(HD)-70S	0	91.9	98.9	86.5
	0	91.6*	95.0	88.8
	0	91.5*	94.0	89.3
	20	91.9*	99.5	86.2
	40	91.5*	94.9	88.8
	45	91.6	95.0	88.7
60	92.0*	95.0	88.7	
		ρ(средние)	96.5	88.1
(D)-50S	0	79.1*	126.7	120.9
	23.8	79.2*	126.8	119.8
	90.0	81.9*	129.2	119.5
		ρ(средние)	127.6	120.0

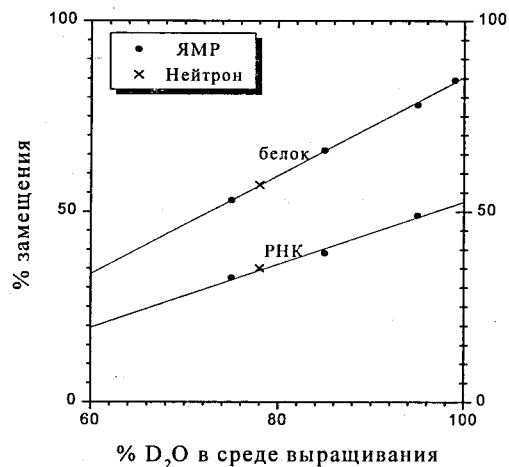


Рис.3 Зависимость величины доли встроенного дейтерия в рибосомные частицы от % D₂O в среде выращивания. ● - данные из ЯМР (Moore, 1979), × - данные из рассеяния нейтронов.

Структура 30S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* Интегральные параметры для 30S субчастицы *Thermus thermophilus*, полученные из данных малоуглового рассеяния, представлены в Таблице 4. Данные для 30S субчастицы *E.coli* были взяты из работы, касающейся модели 70S рибосомы *E.coli* [Svergun et al., 1997a,b].

Таблица 4 Эффективные интегральные параметры

частицы	параметры	рассеяние нейтронов	двухфазная модель
<i>E.coli</i>	$R_{\infty}(\text{Å})$	72±2	71.70
	$R_{\text{pro}}(\text{Å})$	79±3	77.54
	$R_{\text{RNA}}(\text{Å})$	66±2	67.21
	$V(\times 10^3 \text{Å}^3)$	1400±200	1570
	усредненный R-фактор		0.0823
<i>Thermus thermophilus</i>	$R_{\infty}(\text{Å})$	71±3	73.89
	$R_{\text{pro}}(\text{Å})$	80±2	81.97
	$R_{\text{RNA}}(\text{Å})$	66±2	66.85
	$V(\times 10^3 \text{Å}^3)$	1470±200	1601
	усредненный R-фактор		0.0599

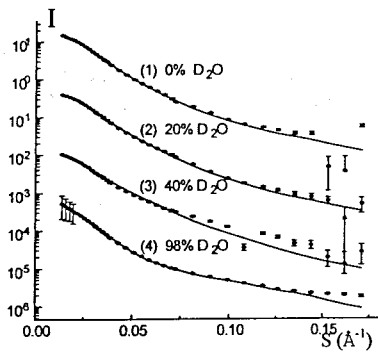
Хорошее совпадение инвариантов для 30S субчастицы *E.coli* и *Thermus thermophilus* позволяет предположить, что их структуры на уровне низкого разрешения достаточно близки. Для проверки этой гипотезы были рассчитаны теоретические кривые рассеяния 30S субчастиц *E.coli*, для значений контрастов компонентов, приведенных в Таблице 5. В целом, модель 30S субчастицы *E.coli* дает разумное согласие с 14

экспериментальными кривыми рассеяния 30S *Thermus thermophilus*: усредненный R-фактор (см. уравнение (7)) составил 8.3%. Обращает на себя внимание, однако, существенно худшее согласие экспериментальных данных с теоретическими для нейтронных кривых с повышенной (больше 70%) концентрацией D₂O (Таблица 5).

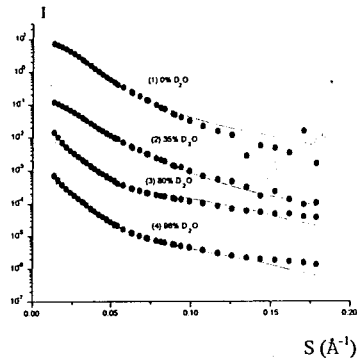
Таблица 5 Контрасты и индивидуальные R_{ik} факторы

Спектрометры	Частицы	% D ₂ O в смеси H ₂ O/D ₂ O	ρ_{pro}	ρ_{RNA}	R _{ik} ($\times 10^{-2}$)	E.coli	Th.th.
V4	(H)-30S	0	1.79	2.27	2.45	2.19	
		35	0.293	1.18	3.46	2.17	
		80	-1.41	-0.069	17.6	7.40	
		98	-2.48	-0.848	7.75	7.34	
V4	(H)-30S	0	1.83	2.27	3.57	2.96	
		20	0.972	1.64	4.25	3.57	
		40	0.11	1.02	9.05	8.09	
		98	-2.37	-0.78	3.87	3.16	
D11	(D)-30S	0	1.8295	2.2646	5.35	3.79	
		32	0.4577	1.2690	3.36	3.07	
		72	-1.2571	0.0246	13.7	10.1	
		99	-2.3716	-0.7843	9.71	8.22	
X33	(D)-30S	0	5.52	3.82	8.79	7.23	
		X-ray	2.26	4.23	5.88	6.46	

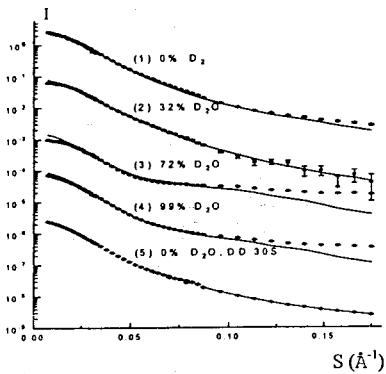
Поскольку точки компенсации белка и РНК составляют 40% и 70% D₂O, соответственно, преобладающий вклад в рассеяние при высоком содержании D₂O вносит белковый компонент. Напрашивается вывод, что основные отличия между двумя типами 30S субчастицы заключены в распределении рибосомных белков, в то время как конформации молекул РНК мало отличаются на уровне низкого разрешения. Для построения модели 30S *Thermus thermophilus* модель 30S субчастицы *E.coli* была взята в качестве начального приближения. формы всей субчастицы и области в ней, занятой рибосомной РНК, представлены функциями оболочек, параметризованными с помощью сферических гармоник (см "материалы и методы"). Обе оболочки были представлены, как и в [Svergun et al., 1997a,b], с мультипольным разрешением до L=7 (что отвечает пространственному разрешению 35 Å). Коэффициенты параметризации определены путем одновременного приближения всего набора экспериментальных данных (14 кривых рассеяния при разных контрастах). Сравнение экспериментальных и теоретических кривых рассеяния представлено на Рис.4 (a-d).



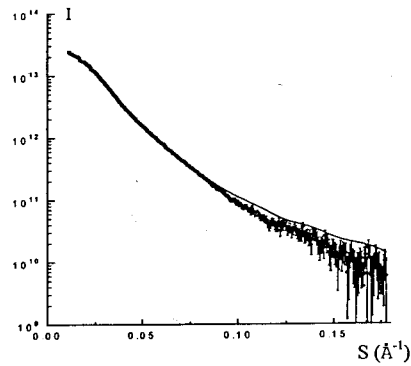
(a)



(b)



(c)



(d)

Рис.4 Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния нейтронов (а - с) и рентгеновских лучей (d) 30S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* (точки), и рассеяние восстановленной двухфазной моделью (сплошные линии). Каждая кривая сдвинута вниз на один порядок по оси ординат относительно предыдущей. (а) (b) - данные получены в НМИ, (с) - ILL, (d) - DESY

Полученная модель (Рис.5) дает существенно лучшее согласие с экспериментальными данными, нежели исходное приближение: усредненный R-фактор равен 6.1%. Сравнение моделей 30S рибосомных субчастиц *Thermus thermophilus* и *E.coli* (Рис.6) показывает, что основные различия заключаются в пространственном распределении белкового компонента, тогда как форма молекул 16S РНК для *Thermus thermophilus* и *E.coli* практически не отличается на данном уровне разрешения.

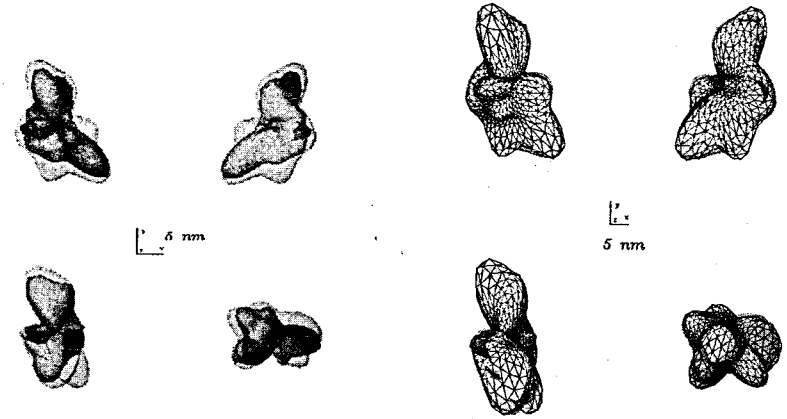


Рис.5 Структурная модель 30S субчастицы рибосомы *Thermus thermophilus* (серый) и рибосомных частиц в однородном ее РНК (темный) с пространственным разрешением 35 Å. Рис.6 Сравнение контуров двух рибосомы *Thermus thermophilus* (серый) и рибосомных частиц в однородном ее РНК (темный) с пространственным разрешением 35 Å. *Thermus thermophilus* изображена в виде сетки, *E.coli* - сплошными телами)

Необходимо отметить также ограничения полученной модели. Прежде всего, согласно теореме Котельникова [Котельников и др., 1950], число независимых параметров, необходимых для описания кривой рассеяния, равно $N_s = s_{\max} D_{\max} / \pi$, и в нашем случае составляет примерно $N_s = 15$. Вариация контраста на двухфазной системе позволяет определять три независимые базисные кривые (см. уравнение (1)), что дает в общей сложности 45 параметров. В то же время, двухфазная модель с использованием гармоник до $L=7$ требует 128 модельных параметров. Несмотря на то, что эти параметры не независимы друг от друга (в частности, из-за неотрицательности функций формы, отсутствия их пересечений друг с другом и т.п.), информационное содержание экспериментальных данных недостаточно для однозначного восстановления модели *ab initio*. Поэтому наличие двухфазной модели 30S субчастицы *E.coli* являлось необходимым условием построения модели для *Thermus thermophilus*. Несмотря на указанные выше ограничения, полученная модель для 30S субчастицы *Thermus thermophilus* дает адекватное представление о структуре на низком разрешении и удовлетворяет большому набору экспериментальных данных рентгеновского и нейтронного рассеяния.

1. В рамках МУРН впервые предложен простой метод определения доли включения дейтерия в необмениваемые позиции РНКого и белкового компонентов в рибосоме. Метод имеет сравнимую с методом ЯМР точность ($\approx 2\%$), однако в отличие от последнего не требует разделения частицы на отдельные составляющие ее компоненты. Показано, что дейтерий преимущественно встраивается в белковой компонент.
2. Методом биосинтетического дейтерирования получены два типа 30S субчастиц рибосом *Thermus thermophilus*, идентичных по структуре, но с существенно разным вкладом в рассеяние от РНКого и белкового компонентов.
3. На трех экспериментальных нейтронных установках получены наборы нейтронных кривых рассеяния для двух типов 30S субчастиц при разных контрастах.
4. По данным малоуглового рассеяния нейтронов методом сферических гармоник впервые построена модель 30S субчастицы рибосом *Thermus thermophilus* и ее РНК с пространственным разрешением 35 Å.
5. Сравнение полученной модели с аналогичной моделью для *E.coli* показывает, что основные различия заключаются в пространственном распределении белкового компонента, тогда как форма молекул 16S РНК для *Thermus thermophilus* и *E.coli* практически не отличается на данном уровне разрешения.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Fan Lixin, Zgurskaya E.I., Scherbakova I. and Serdyuk I.N. // J. Appl. Cryst. 1997, 30, 59-64
 Gavrilova L., Kostiashkina O., Koteliansky V., Rutkevich V. and Spirin A. // J. Mol. Biol. 1976, 101, 537-552
 Котельников В.А., Николаев А.М. Основы радиотехники. М.: Связьтехиздат, 1950
 Moore P // Method in Enzymology 1979, 49, 639-655.
 Serdyuk I.N., Baranov V.I., Tsalkova T.N., Gulyamova D., Pavlov M., Spirin A.S., May R. // Biochimie, 1992, 74, 299-305
 Spirin A., Baranov V., Polubesov G., Serdyuk I. and May R. // J. Mol. Biol. 1987, 194, 119-128
 Svergun D. I., Burkhardt N., Skov Pedersen J., Koch M. H. J., Volkov V. V., Kozin M. B., Meerwink W., Stuhmann H. B., Diedrich G. & Nierhaus K. H. // J. Mol. Biol. 1997, 271, 588-601 (a)
 Svergun D. I., Burkhardt N., Skov Pedersen J., Koch M. H. J., Volkov V. V., Kozin M. B., Meerwink W., Stuhmann H. B., Diedrich G. & Nierhaus K. H. // J. Mol. Biol. 1997, 271, 602-618 (b)

1. **Lixin Fan**, E.I.Zgurskaya and I.N.Serdyuk Determination of deuterium incorporation into RNA and protein components of the *E.coli* ribosome at biosynthetic deuteration by small-angle neutron scattering. J. Appl. Cryst. 1997, 30, 59-64
2. V.Shcherbakova, E. I.Zgurskaya, **Lixin Fan**, I.N.Serdyuk and G. Zaccari Metabolic Regulation of Selective Deuterium Incorporation into RNA and Protein Components of the Ribosome. Biological Macromolecular Dynamics. Proceedings of a Workshop on Inelastic and Quasielastic Neutron Scattering in Biology, Institute Laue-Langevin, Grenoble, France, 14-15 October 1996, 165-169
3. **Lixin Fan**, E.I.Zgurskaya, I. V.Shcherbakova and I.N.Serdyuk Determination of deuterium incorporation in a two-component particle by small-angle neutron scattering. Physica B 234-236, 1997, 196-198
4. Smirnov, M. V Avdeyev, **Lixin Fan**, I.N. Serdyuk, A. Wiedenmann On the resolution function of a neutron small-angle spectrometer with a pin-hole geometry at a steady-state reactor. Proceedings of Young Scientists Conference, JINR, Dubna, Russia, March 19, 1996
5. **Lixin Fan**, V. L. Aksenov, C. Ch. Algalarov, R. Gilles, M. Koch, R. May, V.V. Volkov., O.M. Selivanova, I. N. Serdyuk, D. I, Svergun and A. Wiedenmann. Structural model of the 30S subunit of ribosomes *Thermus thermophilus* from solution scattering. Proceedings of International Workshop on Deuteration of Biological Molecules for Structural and Dynamic Studies. Applications to Neutron Scattering and NMR, May 19-25, 1998, Dubna, Russia
6. **Ликсин Фан**, Д.И. Свергун, В.В. Волков, В.Л. Аксенов, С.Ч. Агаларов, О.М. Селиванова., М. Koch, R. Gilles., A. Wiedenmann, R. May, И. Н. Сердюк Структурная модель рибосомной 30S субчастицы *Thermus thermophilus* с пространственным разрешением 35Å. Рентгеновское и нейтронное исследование. Поверхность, 1998 (в печати)

Рукопись поступила в издательский отдел
27 апреля 1998 года.