



УДК 577.217.345

## ПРИМЕНЕНИЕ СОПОЛИМЕРОВ АКРОЛЕИНА И АКРИЛАМИДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРЕННЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ МАЛОЙ СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ

Резанкин Г. В., Шатский И. И., Богданов А. А.

Межфакультетская лаборатория молекулярной биологии  
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского,

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Исследованы свойства малой субчастицы рибосом *E. coli*, белки которой ковалентно сшиты сополимерами акролеина и акриламида. Показано, что разворачивание таких РНП в «безмагниевого» растворах зависит от длины реагента и среднего расстояния между альдегидными группами в нем: сополимер длиной 80 Å и более полностью фиксировал исходную структуру субчастицы. Степень фиксации возрастала с уменьшением расстояния между альдегидными группами в полимере. Из анализа КД-спектров и кривых плавления РНК в модифицированных РНП в безмагниевого среде следует, что ковалентное сшивание белков фиксирует вторичную структуру заключенной между ними РНК. После удаления из 30S-субчастицы половины белков качественная картина фиксации их компактной структуры сохраняется. Делается заключение, что прямые белок-белковые взаимодействия несущественны для образования компактной 30S-субчастицы. Предполагается, что ее структура создается РНК—РНК-взаимодействиями.

Бифункциональные агенты широко применяются для образования белок-белковых сшивок в нуклеопротеидах и фиксации белков на нуклеиновых кислотах [1—3].

Ранее нами было предложено использовать для ковалентного сшивания белковых субъединиц рибосом сополимеры акролеина и акриламида [4]. Эти соединения оказались удобными реагентами для изучения общей топографии белков в 30S-субчастице бактериальных рибосом и для оценки вклада различных внутририбосомных взаимодействий (РНК-белковых, белок-белковых и РНК—РНК) в организацию компактной нативной структуры этой субчастицы.

В настоящей работе приведены результаты подробного изучения свойств рибосомных рибонуклеопротеидов (РНП) с ковалентными белок-белковыми сшивками, образованными сополимерами акролеина и акриламида. Были исследованы 30S-субчастицы рибосом *E. coli*, а также РНП, полученные отделением от 30S-субчастиц определенных белков путем обработки их 2 и 3 М растворами LiCl (РНП<sub>2</sub> и РНП<sub>3</sub> соответственно).

Сополимеризацию акролеина и акриламида проводили в водных растворах в присутствии небольших количеств аллилового спирта. Инициаторами полимеризации служили персульфат аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Варьируя соотношение между реагирующими веществами, получали полимеры с различным содержанием альдегидных групп. В работе были использованы сополимеры со средним расстоянием

между альдегидными группами ( $l_{CO}$ ) 25, 14 и 9 Å. По окончании реакции смесь полимеров фракционировали гель-фильтрацией на сефадексе G-25. При этом были получены фракции сополимеров с молекулярным весом от 150 до 5000 и максимальными расстояниями между концевыми альдегидными группами от 15 до 200 Å. При гель-фильтрации сополимеров на колонке с сефадексом G-25 было установлено, что элюирующий объем линейно зависел от логарифма их молекулярного веса. Это свидетельствовало в пользу того, что все использованные полимеры находились в одной (развернутой) конформации.

30S-субчастицы рибосом обрабатывали сополимерами акролеина и акриламида в буферных растворах, близких по составу к буферу для реконструкции рибосом (0,05 М триэтанолламин—HCl-буфер, pH 7,9; 0,01 М ацетат магния, 0,3 М KCl), т. е. в условиях, когда они имели предельно компактную структуру. Рибосомные белки в составе 30S-субчастицы имеют около 300 аминокрупп [5], из которых 80—100 групп доступны для реакций с различными химическими агентами [2, 3]. По этим группам, по-видимому, и происходило взаимодействие субчастицы с использованными в работе полиальдегидами. Образующиеся при этом основания Шиффа, а также избыточные альдегидные группы восстанавливались  $NaBH_4$ . Как показали контрольные опыты с сополимером, содержащим радиоактивную метку (для этого полимер предварительно вводили в реакцию с небольшими количествами  $[^3H]$ путресцина с очень высокой удельной активностью), рибосомная РНК в условиях фиксации 30S-субчастицы фактически с ним не связывается (не более 2 молекул полимера на 1 молекулу РНК).

Обработанная сополимерами акролеина и акриламида 30S-субчастица имела близкое к исходному значение коэффициента седиментации.

Одно из фундаментальных свойств субчастиц рибосом заключается в их способности переходить в разрыхленное состояние при удалении из среды ионов магния [6]. Это явление, получившее название процесса разворачивания рибосом, сопряжено с нарушением всех типов внутририбосомных взаимодействий. Сополимеры акролеина и акриламида, специфически взаимодействующие с белками рибосом и в силу своей структуры способные эффективно связывать их ковалентными сшивками, должны фиксировать взаимодействие рибосомных белков друг с другом и, если физические контакты белковых субъединиц важны для формирования компактной структуры рибосом, препятствовать разворачиванию субчастиц рибосом в безмагниевого среде.

Для разворачивания 30S-субчастиц (до и после обработки сшивающими агентами) их растворы диализовали против буферов с этилендиаминтетрауксусной кислотой для удаления ионов магния, а затем против буферных растворов с низкой ионной силой. Превышение коэффициента седиментации модифицированной субчастицы над коэффициентом седиментации необработанной субчастицы ( $s = 14$ — $15S$ , также измеренным в условиях разворачивания) может служить мерой фиксации ее исходной структуры.

Как видно из рис. 1, субчастицы, обработанные сополимерами с молекулярным весом  $\sim 500$  (максимальное  $l_{CO} \sim 15$  Å), после разворачивания имеют коэффициенты седиментации, близкие к контрольным препаратам. Ранее нами было показано, что модификация рибосомных белков глутаровым альдегидом, широко применяющимся для фиксации белков на РНК [3], и диметилловым эфиром дицимида пробковой кислоты (максимальное  $l_{CO} \sim 12$  Å), образующим большое число белок-белковых сшивок в рибосомах [7], также не предотвращает разворачивания 30S-субчастиц рибосом в безмагниевого буферных растворах [4].

Более того, даже после обработки 30S-субчастиц реагентами с длиной цепи 25—40 Å ( $M$  600—1000) они сохраняют способность разворачиваться до частиц с коэффициентами седиментации 20—24S. Отметим здесь,

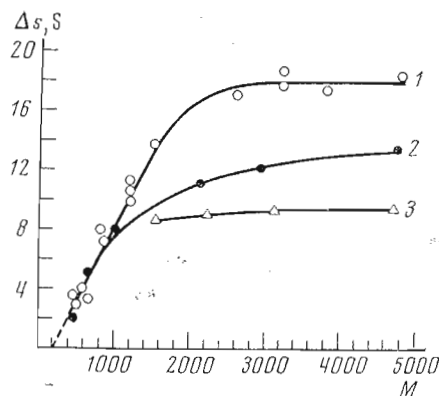


Рис. 1. Зависимость изменения коэффициента седиментации ( $\Delta s$ ) 30S-субчастиц рибосом *E. coli* при модификации их сополимерами акролеина и акриламида от молекулярного веса сополимера при среднем расстоянии между альдегидными группами в сополимере ( $l_{CO}$ ) 9 (1), 14 (2) и 25 Å (3)

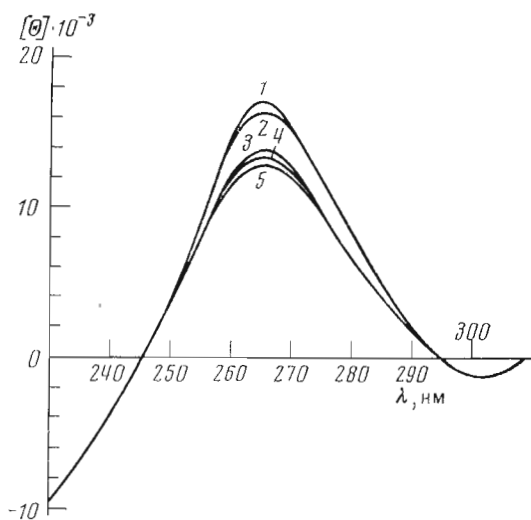


Рис. 2. Спектры КД развернутых 30S-субчастиц до (1) и после модификации глутаровым альдегидом (2), сополимерами акриламида и акролеина с  $l_{CO}$  9 Å (3—5). Кривые 3—5 соответствуют 25S-, 28S- и 30S-частицам

что бифункциональные агенты с расстоянием между активными группами 18—24 Å способны превращать все белки 30S-субчастицы рибосом *E. coli* в ди- и тримеры [8].

30S-субчастицы, полностью сохраняющие свою компактную структуру в безмагниевой среде, могут быть получены только при помощи полиальдегидов с длиной цепи не менее 70—80 Å (молекулярный вес более 2000) и средним  $l_{CO}$  9 Å. При увеличении расстояния между активными группами сополимера его способность фиксировать компактную структуру рибосомной субчастицы снижается: полимеры со средним  $l_{CO}$  14 Å фиксируют структуру только до 28S, а с  $l_{CO}$  25 Å — только до 24S. Поскольку эти реагенты имели достаточную длину для ковалентного связывания белковых субъединиц друг с другом, приходится предположить, что их более низкая фиксирующая активность объясняется тем, что они не способны достаточно эффективно образовывать внутривнутрибелковые сшивки.

Как и следовало ожидать, обработка 16S-РНК полимером, фиксирующим компактную структуру 30S-субчастицы (длиной более 80 Å и  $l_{CO}$  9 Å), никак не сказывалась на ее способности разворачиваться при удалении ионов магния из раствора. Таким образом, отраженная на рис. 1 фиксация 30S-субчастицы различающимися по длине и составу сополимерами акриламида и акролеина обусловлена образованием внутри- и межмолекулярных белок-белковых сшивок.

Интересные различия между развернутыми РНК-частицами, обработанными сополимерами разной длины, обнаруживаются при изучении их оптических свойств.

Известно, что спектры КД таких препаратов, снятые в области длин волн 230—310 нм, характеризуются интенсивной положительной циркулярно-дихроичной полосой, положение максимума и амплитуда которой весьма чувствительны к изменениям их вторичной структуры. Из рис. 2 хорошо видно, что если максимумы первой положительной полосы в спектрах КД модифицированных и немодифицированных субчастиц рибосом совпадают, то амплитуда этой полосы заметно ниже в случае 30S-субчастиц, фиксированных полимерами сравнительно высокого молекулярного веса (кривые 3—5). Понижение амплитуды первой положительной полосы в спектрах КД РНК, как правило, связано с нарушением степени упорядоченности ее вторичной структуры. Ранее в нашей лаборатории было показано, что к понижению амплитуды этой полосы приводит специфическое взаимодействие рибосомных белков с 16S-РНК. Вследствие этого амплитуда первой циркулярно-дихроичной положительной полосы РНК в составе субчастицы ниже, чем у РНК в свободном состоянии. Это различие исчезает при нарушении нативной компактной структуры субчастицы (тепловой денатурацией или разворачиванием) [9].

Можно предположить, что сополимеры акролеина и акриламида, способные ковалентно сшивать белки в достаточно обширной области субчастицы, фиксируют индуцированные рибосомными белками и отражающиеся на спектрах КД изменения в структуре РНК, препятствуя переходу ее в состояние, характерное для свободной РНК. Естественно, что короткие сшивающие агенты (глутаровый альдегид, например) подобных эффектов не дают (рис. 2, 2).

Фиксация вторичной структуры РНК сополимерами акролеина и акриламида отчетливо проявляется при сравнении кривых плавления немодифицированных и обработанных сшивающими агентами субчастиц (рис. 3). Для образования ковалентных белок-белковых сшивок использовали полимеры со средним расстоянием между альдегидными группами 9 Å. РНК в субчастицах, зафиксированных в состояниях, характеризующихся коэффициентами седиментации 25S и выше (рис. 3, 3—5), начинает плавиться при существенно более высокой температуре, чем РНК в составе немодифицированных субчастиц. Короткий фиксирующий агент — глутаровый альдегид задержки в плавлении РНК не вызывает (рис. 3, 2). Очевидно, что этот эффект обусловлен белок-белковыми сшивками, которые затрудняют тепловую денатурацию РНК, находящейся между достаточно удаленными друг от друга белковыми субъединицами рибосомы.

Важной особенностью кривых плавления рибосомной РНК, представленных на рис. 3, является еще и то, что наблюдаемый гиперхромный эффект у фиксированных РНК-частиц заметно ниже, чем у контрольных препаратов. Это вызвано по крайней мере двумя причинами: 1) вторичная структура РНК в фиксированных частицах в интервале температур 20—85° (при более высоких температурах начинается деградация РНК) не разрушается до конца и кривые плавления не выходят на плато; 2) как уже отмечалось при анализе спектров КД, сшивание рибосомных белков может приводить к фиксации изменений, которые они вносят в структуру РНК, что должно отразиться на величине ее гиперхромного эффекта.

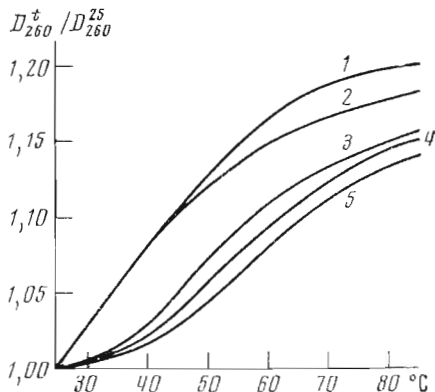


Рис. 3

Рис. 3. Кривые плавления РНК в составе малой субчастицы рибосом до и после модификации сшивающими агентами. Обозначения кривых те же, что и на рис. 2

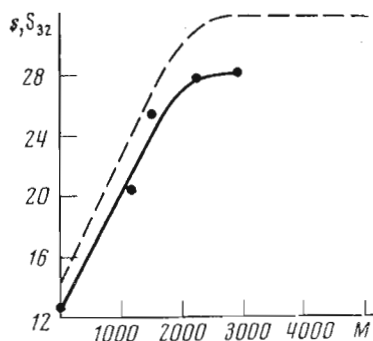


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость коэффициентов седиментации РНК<sub>2</sub>, модифицированных сополимерами акролеина и акриламида с  $l_{CO}$  9 Å, от молекулярного веса сополимера. Пунктиром показана соответствующая зависимость для 30S-субчастиц

При интерпретации данных, полученных в этой части работы, необходимо учитывать два фундаментальных свойства белков 30S-субчастицы рибосом *E. coli*. Во-первых, многие из белков малой субчастицы в ее составе имеют крайне асимметричную структуру, вследствие чего доступные с поверхности участки одних и тех же белков располагаются в различных частях 30S-субчастицы [10, 11]. Во-вторых, из установленной для многих белков рибосом *E. coli* полной или частичной аминокислотной последовательности видно, что остатки лизина (составляющие ~10% всех аминокислот), с которыми в первую очередь взаимодействуют использованные в работе полиальдегиды, расположены вдоль всей полипептидной цепи белков [12]. В таком случае то, что компактную структуру 30S-субчастиц не удается сохранить в безмагнелийной среде при фиксации их сравнительно короткими агентами, означает, что непосредственные физические контакты между белковыми субъединицами (если они и реализуются в рибосомах), по-видимому, несущественны для поддержания этой структуры. Далее, можно предположить, что области белков, находящиеся на поверхности субчастицы, сгруппированы в домены, расстояние между соседними белками в которых составляет 20—40 Å. Сшивание белков друг с другом в таких доменах приводит к фиксации разрыхленного состояния 30S-субчастицы (21—23 S), характерного для одного из промежуточных этапов разворачивания этой субчастицы. И наконец, среднее расстояние между такими доменами не должно превышать 70—80 Å, так как, начиная с такой длины сополимера, происходит полная фиксация структуры субчастицы (рис. 1). Сшивание белков внутри одного домена и в соседних доменах приводит к тому, что РНК субчастицы при ее разворачивании не может перейти в состояние, характерное для свободной РНК в том же растворителе. Вследствие этого в ее макромолекулярной структуре фиксируются изменения, индуцированные рибосомными белками.

Особый интерес для нас представляло выяснение вопроса о том, какие из белков 30S-субчастицы должны входить в состав РНК, чтобы их компактная исходная структура могла быть зафиксирована сополимером акролеина и акриламида.

Как известно, белки рибосом подразделяются на две группы: так называемые основные структурные белки рибосом, прочно связанные с РНК и не отделяющиеся от нее в растворах с высокой концентрацией солей одновалентных металлов, и дополнительные структурные белки рибосом,

сравнительно легко отделяющиеся от РНК в этих условиях [13]. РНП-частицы с основным структурным белком были получены нами обработкой 30S-субчастиц рибосом 2 и 3 М растворами хлористого лития. По данным двумерного электрофореза в полиакриламидном геле, РНП<sub>2</sub> содержали белки S4, S7, S8, S12, S13, S15, S18, S19 и в пониженных количествах S16, S17 и S20, т. е. почти половину белков 30S-субчастиц. В РНП<sub>3</sub> были обнаружены белки S4, S7, S8, S15 и в следовых количествах S19 и S16, 17. Ранее было показано, что группа белков РНП<sub>3</sub> существенно реорганизует структуру 16S-РНК (в частности, вызывает ее сильную компактизацию) и образует РНП, названный структурным остовом 30S-субчастицы [14].

РНП<sub>2</sub> и РНП<sub>3</sub> в компактном состоянии имеют коэффициенты седиментации ~27 и 23,5S соответственно. При разворачивании в стандартных условиях они превращаются в РНП с коэффициентами седиментации 12—13S. Фиксация РНП<sub>2</sub> сополимерами со средним расстоянием между активными группами 9 Å происходит аналогично фиксации 30S-субчастиц и после обработки полимером длиной 70—80 Å РНП<sub>2</sub> сохраняют полностью свою компактную структуру в безмагниево буферном растворе (рис. 4). В этих же условиях РНП<sub>3</sub> имеют коэффициент седиментации ~17,5 S.

Результаты, полученные для РНП<sub>2</sub>, нельзя рассматривать как совершенно неожиданные. Действительно, большая часть белков, входящих в их состав, имеет в 30S-субчастице весьма вытянутую конформацию [10], что позволяет им занимать обширные области на поверхности субчастицы. С другой стороны, возможность фиксации компактной структуры субчастицы после удаления из нее половины белков свидетельствует в пользу сделанного ранее предположения о том, что непосредственные белок-белковые контакты несущественны для организации ее нативной структуры.

В случае РНП<sub>3</sub> составляющие его белки располагаются главным образом в «головке» 30S-субчастицы и примыкающих к ней областях [10, 11]. Естественно поэтому, что структура такого РНП не может быть зафиксирована полностью.

Совокупность экспериментальных данных, полученных в этой работе, приводит к заключению, что компактная нативная структура малой субчастицы рибосом в основном поддерживается РНК — РНК-взаимодействиями, формирующими внутририбосомную третичную структуру 16S-РНК. Природа этих взаимодействий в настоящее время не известна, и ее изучение заслуживает, на наш взгляд, самого пристального внимания.

### Экспериментальная часть

*Выделение рибосом.* Рибосомы выделяли из клеток *E. coli*, шт (мм MRE-600, описанным ранее методом [15]. Субчастицы рибосом получали методом зонального центрифугирования [14].

*Получение РНП.* Осадок 30S-субчастиц суспендировали в 0,01 М Трис-НСl-буфере, содержащем 0,01 М ацетат магния, рН 7,7, и приливали равный объем водного раствора хлористого лития соответствующей концентрации: для получения РНП<sub>2</sub> — 4 М LiCl, для получения РНП<sub>3</sub> — 6 М LiCl. Раствор выдерживали 16 ч при 4°. РНП-частицы осаждались ультрацентрифугированием в течение 7 ч при 45 000 об/мин в роторе Ti 50 на ультрацентрифуге Spinco.

Белковый состав РНП определяли методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле по Кальтшмидту — Витману в модификации Биелки и сотр. [17], концентрацию РНК — спектрофотометрически.

*Синтез сополимеров акриламида и акролеина.* 0,5 г акриламида растворяли в 1 мл воды и затем добавляли акролеин и аллиловый спирт в следующих количествах: для получения сополимеров со средним расстоянием между альдегидными группами 9 Å — 0,14 мл акролеина без аллилового

спирта; 14 Å — 0,25 мл акролеина и 0,25 мл аллилового спирта; 25 Å — 0,125 мл акролеина и 0,25 мл аллилового спирта. Аллиловый спирт добавлялся для обрыва цепи. В качестве инициаторов полимеризации добавляли 20 мг персульфата аммония и 0,035 мл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина. Реакция заканчивалась за 15 мин при 20°. Степень конверсии мономерной смеси 10—15%.

*Разделение сополимеров акриламида и акролеина по молекулярному весу.* Разделение производилось гель-фильтрацией реакционной смеси на колонке с сефадексом G-25 (0,9 × 100 см). Отбирали фракции по 1 мл. Колонка с сефадексом была откалибрована с помощью полимеров акриламида. Молекулярный вес полиакриламида, выходящего в данном объеме колонки, определялся методом седиментационного равновесия на сканирующей аналитической ультрацентрифуге с ультрафиолетовой оптикой Spinco, модель E. Средняя квадратичная ошибка определения ± 8%.

*Анализ состава сополимеров.* Содержание альдегидных групп в синтезированных сополимерах определяли спектрофотометрически по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [16]. Калибровочная кривая была построена по пропионовому альдегиду. Точность определения ± 10%.

*Обработка 30S-субчастиц, РНП<sub>2</sub> и РНП<sub>3</sub> сополимерами акриламида и акролеина.* 30S-субчастицы диализовали против 0,05 М триэтаноламин-НСI-буфера (рН 7,9), содержащего 0,01 М ацетат магния и 0,3 М хлористый калий. Раствор рибосом (0,3—0,7 мг/мл) смешивали с равным объемом раствора сополимеров в воде (2,0—0,5 мг/мл), выдерживали 1 ч при 20° и реакционную смесь затем обрабатывали 1,5 ч при 4° NaBH<sub>4</sub> в конечной концентрации 1,5 мг/мл.

*Разворачивание 30S-субчастиц и РНП<sub>2</sub>, РНП<sub>3</sub>.* 30S-субчастицы, нативные и модифицированные, диализовали против 0,01 М Трис-НСI-буфера (рН 7,4), содержащего 0,01 М этилендиаминтетрауксусную кислоту и 0,1 М хлористый калий, в течение 5 ч для удаления понов магния. Затем раствор диализовали 12—14 ч против 0,01 М Трис-НСI-буфера, рН 7,8, при 4°. Большая часть несвязанного сополимера в этих условиях удалялась. Оставшуюся неотдиализованную часть сополимера в некоторых опытах отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100.

Аналогичным образом осуществляли разворачивание РНП<sub>2</sub> и РНП<sub>3</sub>.

*Стандартный буфер* для проведения всех измерений — 0,01 М Трис-НСI, рН 7,8.

*Седиментационные измерения* проводили при 20° на сканирующей ультрацентрифуге Spinco, модель E, с ультрафиолетовой оптикой. Точность измерения ± 0,8S.

*Зависимость оптического поглощения от температуры* измеряли при длине волны 260 нм в 1-см кювете на автоматическом спектрофотометре АСТА-6М (США) с автоматизированным нагревателем образца. Скорость нагрева 2° в 1 мин.

*Измерение кругового дихроизма* осуществляли на автоматическом дихрографе Joan II (температура измерения 25°; 1-см кюветы). Результаты выражали в единицах эллиптичности на 1 нуклеотидный остаток (град·см<sup>2</sup>/дмоль).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Traut R. R., Heimark R. L., Sun T.-T., Hershey J. W. B., Bollen A. (1974) in Ribosomes (Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., eds.), pp. 271—308, Cold Spring Harbor.
2. Peretz H., Towbin H., Elson D. (1976) Eur. J. Biochem., 63, 83—92.
3. Нехорошев С. А., Прессман Е. К., Савдахчиев Л. С., Севастьянов А. П. (1971) Биохимия, 36, 580—586.
4. Резапкин Г. В., Шатский И. Н., Богданов А. А. (1976) Докл. АН СССР, 229, 1258—1261.
5. Kaltschmidt E., Dzionara M., Wittmann H. G. (1970) Mol. and Gen. Genet., 109, 292—297.

6. Спирин А. С., Киселев Н. А., Шакулов Р. С., Богданов А. А. (1969) Биохимия, 28, 920—930.
7. Bickle T. A., Hershey J. W. B., Traut R. R. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1327—1331.
8. Lutter L. C., Kurland C. G., Stöffler G. (1975) FEBS Lett., 54, 144—150.
9. Шатский И. Н., Бояи И. В., Чичкова Н. В., Богданов А. А. (1971) Молекулярн. биология, 5, 817—822.
10. Tischendorf G. W., Zehardt H., Stöffler G. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4820—4824.
11. Lake J. A., Kahan L. (1975) J. Mol. Biol., 99, 631—644.
12. Wittman H. G., Wittmann-Liebold B. (1974) in Ribosomes (Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., eds.), pp. 115—149, Cold Spring Harbor.
13. Спирин А. С., Гаврилова Л. П. (1971) в кн. Рибосома, с. 110—120, «Наука», М.
14. Копылов А. М., Тетерина Н. Л., Василенько С. К., Богданов А. А. (1976) Биорган. химия, 2, 1642—1651.
15. Шатский И. Н., Чичкова Н. В., Богданов А. А. (1971) Молекулярн. биология, 5, 149—156.
16. Кричфилд Ф. К. (1965) Анализ основных функциональных групп в органических соединениях, с. 96—99, «Мир», М.
17. Weifle H., Stahl J., Bielka H. (1971) Biochim. et biophys. acta, 243, 416—419.

Поступила в редакцию  
5.VIII.1976

#### USE OF ACROLEIN AND ACRYLAMIDE COPOLYMERS FOR INVESTIGATION OF INTERNAL ORGANIZATION OF SMALL RIBOSOMAL SUBUNITS

REZAPKIN G. V., SHATSKY I. N., BOGDANOV A. A.

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

The proteins of 30S subunits of *E. coli* ribosomes were cross-linked with copolymers of acrolein and acrylamide. The unfolding of the cross-linked RNP in magnesium-free buffers was shown to be dependent on the length of reagents and the average distance between aldehyde groups: the unfolding of the subparticles cross-linked by relatively short agents (length about 15 Å) was not different from that of unmodified 30S particles; with copolymers of 25-40 Å length, the unfolded particles had the sedimentation coefficients about 20-24 S; the copolymers having the length of more than 80 Å completely fixed the initial compact structure of 30S subunits. It follows from the analysis of CD spectra and melting curves of modified particles in magnesium-free buffers that cross-linking of ribosomal proteins stabilizes the secondary structure of the RNA fragments which are located between these proteins. The removal of one half of proteins from 30S particles practically does not affect the pattern of fixation of their compact structure. It is suggested that direct protein-protein interactions are not essential for organization of compact structure of 30S subunits. On the contrary, this structure is assumed to be held up by the RNA-RNA interactions.