



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.04

ИЗМЕНЕНИЯ РНК-БЕЛКОВЫХ КОНТАКТОВ В ПРОЦЕССЕ
САМОСБОРКИ 30S СУБЧАСТИЦ РИБОСОМ *E. COLI*,
ОБНАРУЖИВАЕМЫЕ МЕТОДОМ УФ-ИНДУЦИРОВАННЫХ
РНК-БЕЛКОВЫХ СПИВОВ*Ишвазян А. Д., Абдурашидова Г. Г., Турчинский М. Ф.,
Будовский Э. И.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Конформационные изменения рибосомных нуклеопротеидов при их самосборке обусловлены и/или сопровождаются изменениями различного рода взаимодействий, в частности взаимодействий между рибосомными белками и РНК. Одним из этапов самосборки 30S субчастиц рибосом *E. coli* является переход так называемых RI-частиц в RI*-частицы [1, 2]. Добавление 16S РНК к полной смеси белков 30S субчастиц рибосом *E. coli* при 0—10° С приводит к образованию RI-частиц — комплекса 16S РНК с неполным набором белков (отсутствуют белки S1, S2, S10, S14, S21) [2]. Для завершения самосборки необходима инкубация RI-частиц при 40° С. При этом происходит превращение RI-частиц в RI*-частицы, что делает возможным присоединение недостающих белков и образование функционально активных 30S субчастиц [1, 2]. Ранее было показано, что переход RI в RI* сопровождается изменениями конформации 16S РНК [3]. В настоящей работе с помощью образования УФ-индуцированных полинуклеотид-белковых сшивок показано, что этот переход сопровождается существенными изменениями взаимодействий 16S РНК с белками в составе RI-частиц.

70S рибосомы и 30S субчастицы были получены по описанным ранее методикам [4, 5]. 30S субчастицы (16,6 мг) диссоциировали на РНК и белки в 4 мл 20 мМ трис-НСl (рН 7,7), содержащем 4 М LiCl и 4 М мочевины (0° С, 24 ч) [6]. Осадок 16S РНК растворяли в 5 мл буфера А (20 мМ MgCl₂, 50 мМ NH₄Cl, 30 мМ трис-НСl, рН 7,7) и диализовали (3×1 л) при 4° С против того же буфера. Рибосомная РНК давала однородный пик при электрофорезе в полиакриламид-агарозном геле [7].

Раствор рибосомных белков диализовали при 4° С (3×1 л) против буфера Б (1 М NH₄Cl, 20 мМ MgCl₂, 20 мМ трис-НСl, рН 7,7). Половину (160 ОЕ₂₆₀) препарата 16S РНК смешивали при 0° С с раствором белка и буфером А так, что конечная концентрация NH₄Cl составляла 300 мМ, и после инкубации 30 мин при 0° С седиментировали в роторе SW-50 (48 000 об/мин, 4° С, 4 ч) центрифуги Beckmann L5-50.

Осадок RI-частиц растворяли в буфере В (20 мМ MgCl₂, 200 мМ NH₄Cl, 20 мМ трис-НСl, рН 7,7). Аликвоту (60 ОЕ₂₆₀) полученных RI-частиц

**Рибосомные белки, пришивающиеся к 16S РНК в составе
RI и RI*-частиц и 30S субчастиц рибосом [11] при УФ-облучении ***

Рибосомные белки	RI	RI *	30S [11]
S4	80±2	25±2	3
S7	20±1	45±2	52
S9+S11	—	15±1	2,5
S12	—	4±1	—
S15+S16+S17	—	11±1	18
S19+S20+S21	—	—	24,5

* Приведен % от общей радиоактивности участков геля, содержащих [¹²⁵I]-меченные белки ($1 \cdot 10^4$ — $4 \cdot 10^4$ имп/мин). Средний фон участков геля, не содержащих радиоактивные белки, —50—80 имп/мин.

прогревали при 40° С 40 мин для превращения их в RI*-частицы. Белковый состав RI- и RI*-частиц был проведен двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) по модифицированному нами методу Меца и Богорада [8, 9]. В RI- и RI*-частицах отсутствовали белки S1, S2, S10, S14, S21. При добавлении к RI*-частицам суммы белков из 30S субчастиц в буфере Б, инкубации в течение 1 ч при 0° С и седиментации образующихся рибонуклеопротеидов (РНП) в условиях, описанных выше, были получены РНП-частицы, седиментирующие в сахарозном градиенте (10—30% сахара на буфере В) вместе с заведомыми 30S субчастицами. Полученные таким образом 30S субчастицы связывали [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} в присутствии poly(U) на 70% (ср. [4]).

RI- и RI*-частицы облучали при 4° С в буфере Б полным светом ртутной лампы низкого давления ($\lambda_{\text{макс}}$ 254 нм) дозами 30 квантов на нуклеотид (ср. [9]), осаждали двумя объемами этанола и 16S РНК с пришитыми белками выделяли центрифугированием в сахарозном градиенте, содержащем додецилсульфат натрия и EDTA, как было описано ранее [9]. 16S РНК в этих условиях давала однородный пик, что указывало на отсутствие в ней скрытых разрывов. Белки, ковалентно сшитые с РНК, метили ¹²⁵I [9], 16S РНК гидролизovali панкреатической РНКазой, добавляли в качестве свидетелей немеченные белки 30S субчастицы и гидролизат разделяли двумерным электрофорезом в ПААГ [9]. После окрашивания белков красителем кумасси голубым R-250 гель авторадиграфировали и [¹²⁵I]белки идентифицировали, как было описано ранее [9]. Участки геля с [¹²⁵I]-мечеными белками вырезали и определяли радиоактивность с помощью γ -радиоспектрометра LG-30 Intertechnique (Франция).

Как видно из таблицы, в составе неактивированных RI-частиц к 16S РНК пришиваются всего два белка (S4 и S7) в отношении 4:1 (по [¹²⁵I]-метке). В тех же условиях в активированных RI*-частицах к 16S РНК пришиваются по крайней мере пять белков, причем отношение пришитых белков S4 к S7 изменяется на 1:2.

Сравнение набора белков, пришивающихся к 16S РНК в RI- и RI*-частицах, с тем набором белков, который пришивается к 16S РНК при облучении 30S субчастиц [9—11], показывает, что два последних набора достаточно близки. Как в RI*-частицах, так и в 30S субчастицах основным пришивающимся белком является S7. Это указывает на то, что конформационные превращения, происходящие с 16S РНК при переходе RI в RI*, сопровождаются такими изменениями в РНК-белковых контактах, которые приближают структуру последних к структуре 30S субчастиц. В то же время некоторые различия в РНК-белковых контактах между RI* и 30S субчастицами, вероятно, связаны с тем, что присоединение к RI*-частицам недостающих белков приводит к дополнительным изменениям конформации и РНК-белковых контактов в субчастицах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Held W. A., Nomura M. (1973) *Biochemistry* **12**, 3273-3281.
2. Nomura M., Held W. A. (1974) in: *Ribosomes* (Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., eds), pp. 193-223, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N. Y.
3. Копылов А. М., Шалаева Е. С., Богданов А. А. (1974) Докл. АН СССР, **216**, 1178-1181.
4. Traub P., Mizushima C., Lowry C. U., Nomura M. (1971) in: *Methods in Enzymology* (Moldave K., ed.), vol. XX, pp. 391-408, Acad. Press, N. Y. - London.
5. Eikenberry E. F., Bickle T. A., Traub R. R., Price C. A. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 113-116.
6. Traub P., Nomura M. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 777-784.
7. Dahlberg A. E., Dingman C. W., Peacock A. C. (1969) *J. Mol. Biol.*, **41**, 133-147.
8. Metz L., Bogorad L. (1974) *Anal. Biochem.*, **57**, 200-210.
9. Турчинский М. Ф., Броуде Н. Е., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Будовский Э. И. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1013-1020.
10. Броуде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1687-1689.
11. Броуде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 1352-1360.

Поступило в редакцию
22.X.1979

ALTERATION OF THE RNA-PROTEIN CONTACTS IN THE COURSE OF SELF-ASSEMBLY OF *E. COLI* 30S RIBOSOMAL SUBUNITS AS REVEALED BY FORMATION OF THE UV-INDUCED RNA-PROTEIN CROSSLINKS

PIVAZYAN A. D., ABDURACHIDOVA G. G., TURCHINSKY M. F., BUDOWSKY E. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

UV irradiation (λ 254 nm) of the RI and RI* particles, the intermediates in the self-assembly of *E. coli* 30S ribosomal subunits, causes the formation of covalent polynucleotide-protein crosslinks. After incorporation into the crosslinked proteins of ^{125}I they were identified by two-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel. The label in the proteins crosslinked with 16S RNA is distributed between S4 (80%) and S7 (20%) in the case of IR particles, and between S4 (25%), S7 (45%), S9+S11 (15%), S12 (4%), and S15+S16+S17 (11%) in the case of IR* particles.