



УДК 547.96.04

## БЕЛКИ 30S СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ *E. COLI*, УЧАСТВУЮЩИЕ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С МАТРИЧНОЙ РНК

*Броуде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И.,  
Будовский Э. И.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Для изучения рибосомных белков, участвующих во взаимодействии с матрицей, использован метод УФ-индуцированных сшивок. Показано, что белки S4, S5, S9, 11, S18 и S21 образуют ковалентную связь с матрицей в комплексе 30S·1F3·QβРНК. Менее эффективно с матрицей сшиваются также белки S7, S8, S12 и S15–17 (белок S1 не анализировали). Фактор инициации 3 в изученном комплексе сшивается с 16S РНК и не сшивается с QβРНК. Полученные данные позволяют предположить, что в тройном комплексе 30S·1F3·QβРНК фактор инициации 3 в основном взаимодействует с 30S субчастицей и влияет на связывание матрицы через конформационную перестройку 30S субчастицы.

Одним из важных моментов функционирования рибосомы является связывание ее с матрицей. В этом процессе основную роль играет малая субчастица рибосом [1]. Для идентификации компонентов 30S рибосом *E. coli*, вовлеченных во взаимодействие с матрицей, были использованы различные экспериментальные подходы: аффинное мечение рибосомных белков аналогами матрицы [2], химическая инактивация белков и последующая реконструкция 30S субчастицы в присутствии немодифицированных белков [3–5], экранирование матрицей отдельных компонентов от химического или ферментативного воздействия [6, 7] и др. Каждый из перечисленных методов имеет свои ограничения, поэтому необходимо применение независимых подходов для увеличения достоверности полученных результатов.

Для изучения РНК-белковых взаимодействий в системе трансляции в нашей лаборатории используется метод фиксации РНК-белковых контактов с помощью УФ-индуцированных сшивок [8–10]. В настоящей работе с помощью этого метода идентифицированы белки 30S субчастицы рибосом *E. coli*, находящиеся в непосредственном контакте с мРНК (в качестве которой использована РНК фага Qβ) в составе прединициаторного комплекса 30S·1F3·мРНК.

Для анализа рибосомных белков, ковалентно связывающихся с матричной РНК при УФ-облучении, нами был использован описанный ранее подход [9]. Мы показали (рис. 1), что основная радиоактивность на электрофореграмме соответствует белкам S4, S5, S18, S21 и смеси белков S9, 11. В меньших количествах метка содержится также в белках S7, S8, S12 и S15, 16, 17, а радиоактивность в области белка 1F3 практически отсутствует. Белок S1, как уже отмечалось ранее [9], методом двумерного фореа иден-

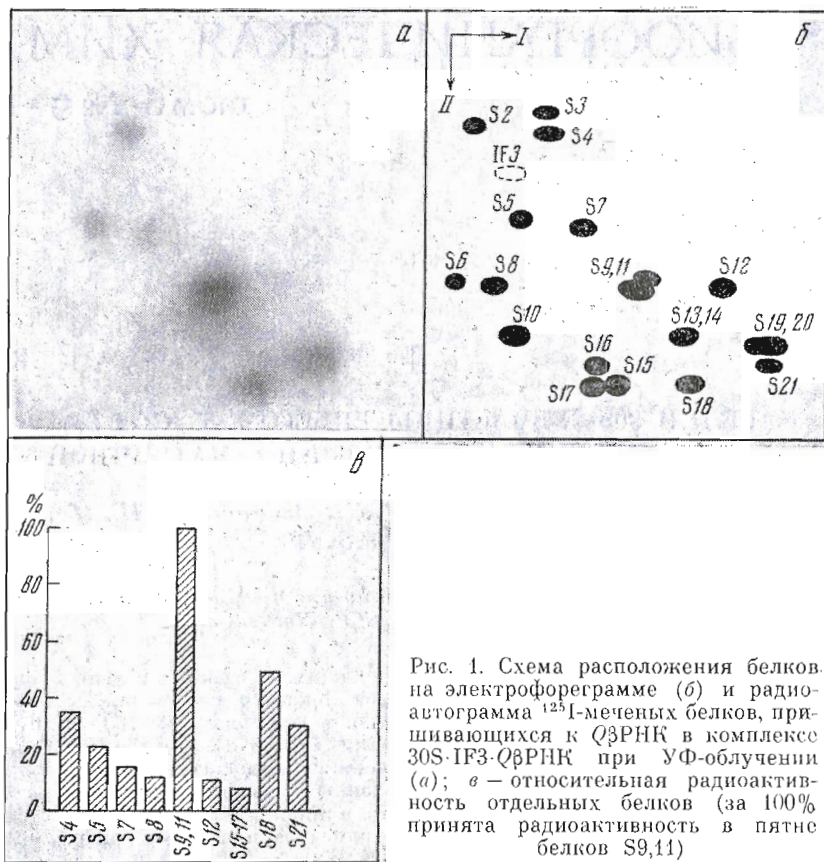


Рис. 1. Схема расположения белков на электрофореграмме (б) и радиоавтограмма  $^{125}\text{I}$ -меченых белков, пришивающихся к  $\text{Q}\beta\text{PHK}$  в комплексе  $30\text{S}\text{-IF3}\text{-Q}\beta\text{PHK}$  при УФ-облучении (а); в — относительная радиоактивность отдельных белков (за 100% принята радиоактивность в пятне белков S9,11)

тифицировать не удастся. Следует отметить, что при связывании 30S субчастиц с  $\text{Q}\beta\text{PHK}$  и облучении такого комплекса в отсутствие фактора инициации количество рибосомных белков, шитых с  $\text{Q}\beta\text{PHK}$ , составляет 10–15% от количества белков, шшивающихся с матрицей в присутствии IF3 (наборы белков в этих двух случаях различаются). Это коррелирует с нашими и литературными данными по стимуляции связывания матрицы с 30S субчастицами в присутствии фактора инициации 3 [11].

Сопоставление полученных нами результатов с литературными данными позволяет выделять ряд белков, обнаруживаемых несколькими методами как мРНК-связывающие. Сближенность с матрицей белков S4, S12, S18 и S21 была показана ранее с помощью фотоаффинного связывания аналогами три- и тетрауклеотидов [12–15]. Участие этих же белков во взаимодействии с матрицей было отмечено при модификации белков малеиновым ангидридом (S4, S12, S18) [4] и 2-метокси-5-нитротропоном (S12, S21) [5]. Белки S4, S18 и S21 давали сшивку с аналогами матрицы poly(S<sup>4</sup>U) и poly(Br<sup>5</sup>U) [16, 17]. Белок S5 метился фотоаффинными аналогами олигодениловой кислоты [2] и был обнаружен как мРНК-связывающий при модификации белков в присутствии бенгальского розового [3].

Таким образом, на основании наших и приведенных выше литературных данных можно заключить, что область связывания матрицы на 30S субчастице является достаточно протяженной и включает в себя, по-видимому, белки S4, S5, S9, 11, S12, S18 и S21. Кроме того, наши результаты позволяют считать, что белки S7, S8 и один или несколько белков из группы S15–17 также участвуют в контакте 30S субчастицы с матрицей.

Роль фактора IF3 в связывании матрицы до сих пор остается неясной. Ряд экспериментальных данных, полученных нами [9] и в других лабора-

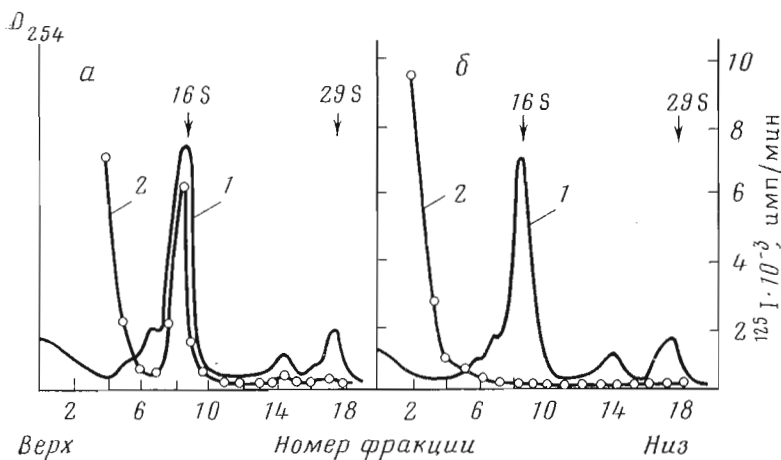


Рис. 2. Профиль разделения компонентов комплекса 30S-[ $^{125}\text{I}$ ]IF3-Q $\beta$ РНК после УФ-облучения (а) и без облучения (б) в градиенте концентрации сахарозы (5–20% сахара, 0,1% додецилсульфат натрия, 10 мМ EDTA, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5). 1 – поглощение, 2 – радиоактивность. а – облученный образец, б – необлученный контроль. На профиле видна частичная деградация Q $\beta$ РНК

ториях [18, 19], свидетельствует о том, что присоединение IF3 к 30S субчастице вызывает ее конформационную перестройку, причем область конформационного влияния IF3 частично затрагивает мРНК-связывающие белки S4, S5, S8, S12, S11 (подробнее см. [9]). Мы показали (рис. 2), что при добавлении матрицы к комплексу 30S·IF3 и УФ-облучении фактор инициации 3 образует ковалентную сшивку с 16S РНК 30S субчастицы и практически не связывается с Q $\beta$ РНК. С учетом известных данных о конформационной перестройке 30S субчастицы под действием IF3 наши результаты позволяют предположить, что, связываясь с 30S субчастицей и вызывая ее перестройку, фактор инициации, таким образом, косвенно влияет на связывание 30S субчастицы с матричной РНК.

### Экспериментальная часть

70S рибосомы *E. coli* MRE 600 получали по модифицированному методу Курланда [20]. 30S субчастицы выделяли диссоциацией и центрифугированием 70S рибосом в сахарозном градиенте в присутствии 0,7 мМ MgCl<sub>2</sub>. Перед использованием 30S субчастицы активировали по Замир и др. [21]. Фактор инициации 3 выделяли по методу Миллера и Вабы [22]. Выделенный IF3 стимулировал связывание Q $\beta$ РНК с 30S субчастицами (контроль за комплексообразованием проводили методом фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры).

Фаг Q $\beta$  выращивали на *E. coli* A 19 по методу Штрауса и Синсхаймера [23], фаговую РНК выделяли депротенизацией в присутствии додецилсульфата лития с последующим центрифугированием в сахарозном градиенте [24]. Фракции, содержащие целую РНК, осаждали спиртом. Для образования комплекса 15 ОЕ<sub>260</sub> 30S субчастиц, 25 мкг IF3 и 5 ОЕ<sub>260</sub> Q $\beta$ РНК смешивали в 200 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис·HCl (pH 7,5), 60 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 8 мМ MgCl<sub>2</sub> и 6 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. После выдерживания 15 мин при 37° С смесь при охлаждении во льду и перемешивании облучали 20 мин полным светом ртутных ламп низкого давления (интенсивность падающего светового потока  $5,7 \cdot 10^{16}$  квант/мин/см<sup>2</sup>). После облучения в пробу добавляли додецилсульфат натрия до 1% и EDTA до 10 мМ, наслаивали на 5–20% сахарозный градиент, приготовленный на буфере, содержащем 0,1% додецилсульфат Na и 10 мМ EDTA. Центрифугировали 17 ч при 30 000 об/мин в роторе SW-40. Из градиента выделяли

фракции, содержащие целую фаговую РНК (s 29S) с пришитыми белками, белки иодировали [<sup>125</sup>I] и идентифицировали их методом двумерного геле-электрофореза после исчерпывающего расщепления РНК смесью нуклеаз А и Т<sub>1</sub>, как описано ранее [9] (рис. 1).

В ряде опытов использовали радиоактивно меченый [<sup>125</sup>I]IF3. В этих экспериментах следили за ковалентным связыванием только IF3, анализируя облученные смеси в сахарозном градиенте в присутствии додецилсульфата Na и EDTA в описанных выше условиях. Во фракциях градиента регистрировали поглощение и радиоактивность (результаты см. рис. 2).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Takanami M., Okamoto T. (1963) *J. Mol. Biol.*, 7, 323–333.
2. Towbin H., Elson D. (1978) *Nucl. Acids Res.*, 5, 3389–3407.
3. Thomas G., Sweeney R., Chang C., Noller H. F. (1975) *J. Mol. Biol.*, 95, 91–102.
4. Cantrell M., Craven G. R. (1977) *J. Mol. Biol.*, 115, 389–402.
5. Chang C., Craven G. R. (1977) *J. Mol. Biol.*, 117, 401–408.
6. Noller H. F., Chang C., Thomas G., Aldridge J. (1971) *J. Mol. Biol.* 51, 669–679.
7. Rummel D. P., Noller H. F. (1973) *Nature New Biol.*, 245, 72–75.
8. Turchinsky M. F., Broude N. E., Kussova K. S., Abdurachidova G. G., Muchamedgeanova E. V., Shatsky I. N., Bystrova T. F., Budowsky E. I. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 90, 83–88.
9. Броуде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. (1979) *Биоорганическая химия*, 5, 1352–1360.
10. Abdurachidova G. G., Turchinsky M. F., Aslanov Kh. A., Budowsky E. I. (1979) *Nucl. Acids Res.*, 6, 3891–3909.
11. Vermeer C., van Alphen W., van Knippenberg P., Bosch L. (1973) *Eur. J. Biochem.*, 40, 295–308.
12. Pongs O., Stöffler G., Lanka E. (1975) *J. Mol. Biol.*, 99, 301–315.
13. Pongs O., Rossner E. (1976) *Nucl. Acids Res.*, 3, 1625–1633.
14. Pongs O., Stöffler G., Bald R. W. (1976) *Nucl. Acids Res.*, 3, 1635–1646.
15. Lührmann R., Gassen H. G., Stöffler G. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 66, 1–9.
16. Fiser J., Scheit K. H., Stöffler G., Kuechler E. (1975) *FEBS Lett.*, 56, 226–229.
17. Fiser J., Scheit K. H., Kuechler E. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 74, 447–456.
18. Ewald R., Pon C., Gualerzi C. (1976) *Biochemistry*, 15, 4786–4791.
19. Michalsky C. J., Sells B. H., Wahba A. J. (1976) *FEBS Lett.*, 71, 347–350.
20. Kurland C. G. (1971) in: *Methods of Enzymology*, vol. XX, pp. 379–381, Acad. Press, N. Y.
21. Zamir A., Miskin R., Vogel Z., Elson D. (1974) in: *Methods in Enzymology*, vol. XXX, part F, pp. 406–426, Acad. Press, N. Y.
22. Wahba A. J., Miller M. J. (1974) in: *Methods in Enzymology*, vol. XXX, part F, pp. 3–18, Acad. Press, N. Y.
23. Strauss J. H., Sinsheimer R. L. (1963) *J. Mol. Biol.*, 7, 43–54.
24. Muller K., Noll H. (1976) *Anal. Biochem.*, 70, 274–278.

Поступила в редакцию  
8.II.1980

#### PROTEINS OF 30S SUBUNIT OF *E. COLI* RIBOSOMES INVOLVED IN THE INTERACTION WITH MESSENGER RNA

BROUDE N. E., KUSSOVA K. S., MEDVEDEVA N. I., BUDOWSKY E. I.

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

A method of UV-induced crosslinks was used to study the ribosomal proteins interacting with messenger RNA. The proteins S4, S5, S9,11, S18 and S21 were shown to form covalent bonds with messenger RNA in the complex 30S·IF3·Q $\beta$ RNA. Less effective covalent bonds were formed by proteins S7, S8, S12 and S15–17 (protein S1 was not analyzed). Initiation factor 3 was shown to crosslink with 16S RNA but not with Q $\beta$ RNA. The data obtained support the idea that IF3 predominantly interacts with the 30S subunit in the complex 30S·IF3·Q $\beta$ RNA, and that it influences the binding of messenger RNA via a conformational rearrangement of the 30S subunit.