



УДК 547.963.32.04 + 577.23

**ИЗМЕНЕНИЕ РНК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
В 30S-СУБЧАСТИЦЕ РИБОСОМ *E. COLI* ПРИ ОБРАЗОВАНИИ
КОМПЛЕКСА С ФАКТОРОМ ИНИЦИАЦИИ 3**

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

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

Образование комплекса 30S-субчастицы рибосом *E. coli* с фактором инициации 3 (IF 3) является необходимым этапом при инициации белкового синтеза на природной мРНК [1] и существенно увеличивает скорость образования и стабильность комплекса 30S-субчастицы с poly(U) и аминоктил-тРНК [2]. Данные, полученные Галерзи с сотр. [3—5], позволяют предположить, что образование комплекса 30S·IF3 сопровождается изменением конформации 30S-субчастиц.

Очевидно, что изменение конформации 30S-субчастицы является следствием изменения взаимодействий между 16S-РНК и рибосомными белками. В нашей лаборатории для изучения контактов между полинуклеотидами и белками в сложных нуклеопротеидах используется метод УФ-индуцированного образования ковалентных полинуклеотид-белковых сшивок [6]. В частности, с помощью этого метода было показано наличие прямого взаимодействия 16S-РНК с IF3 в составе комплекса 30S·IF3 [7]. В настоящей работе приводятся данные, позволяющие заключить, что при образовании этого комплекса изменяются контакты между 16S-РНК и рибосомными белками.

Для идентификации белков, ковалентно связанных с 16S-РНК в результате облучения комплекса 30S·IF3, был использован прием, описанный ранее [6]. Фракцию белков, пришитых к РНК, метили радиоактивным иодом, РНК гидролизовали смесью нуклеаз А и T₁ и белки идентифицировали методом двумерного гель-электрофореза. Для белков, ковалентно связанных с фрагментами РНК, в использованных условиях гель-электрофореза наблюдается регулярный сдвиг в одном направлении, что облегчает их идентификацию [6].

Результаты, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что при УФ-облучении комплекса 30S·IF3 с 16S-РНК кроме белков S3, S4, S7, S9, 11 и S18, связывающихся с РНК в свободной 30S-субчастице, связываются также белки S8, S10, S12 и S20, 21.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить об изменении РНК-белковых контактов при образовании комплекса 30S·IF3. Данные этой работы согласуются с представлением о том, что наиболее важной, если не единственной, функцией фактора инициации 3 является воздействие на конформацию 30S-субчастицы, в результате которого облегчается образование полного инициаторного комплекса [2].

Относительные количества белков, пришивающихся к 16S-РНК
в составе 30S-субчастицы и в составе комплекса 30S-IF3 *

Белки	30S-субча- стица	Комплекс 30S-IF3	Белки	30S-субча- стица	Комплекс 30S-IF3
S3, 4	0,10	0,13	S12	—	0,06
S6	0,08	0,05	S15, 16	0,14	0,11
S7	0,32	0,15	S18	0,16	0,12
S8	—	0,04	S20, 21	—	0,08
S10	—	0,05	IF3	—	0,10
S9, 11	0,20	0,11			

* Относительное количество белков определяли по соотношению метки, содержащейся в пятне данного белка, к количеству всей метки, снятой с электрофореза.

Экспериментальная часть

30S-субчастицы рибосом *E. coli* MRE 600 выделяли из 70S-рибосом, дважды промытых 1 М NH_4Cl [8], активировали по Замир и др. [9], осаждали спиртом и хранили при -10° . Фактор инициации 3 выделяли из промывок рибосом 1 М NH_4Cl по методу Вабы и Миллера [10]. Проверка полученных препаратов белка методом гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [11] показала, что чистота фактора IF3 составляет не менее 80%. Комплекс 30S-IF3 получали в буфере, содержащем 10 мМ трис- HCl (рН 7,8), 8 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl , 5 мМ β -меркаптоэтанол. В 200 мкл конечного объема содержалось 1—5 OE_{260} 30S-субчастиц, количество IF3 в молях превышало количество 30S-субчастиц в 3—10 раз. Смесь инкубировали 15 мин при 37° , а затем при перемешивании и охлаждении до 0° облучали 40 мин УФ-светом от двух ртутных ламп (15 Вт) низкого давления (световой поток $2,5 \cdot 10^{17}$ квант/мин/см², поглощенная энергия $5 \cdot 10^6$ квант/субчастица).

Для выделения РНК с ковалентно связанными белками образцы обрабатывали 1% раствором додецилсульфата натрия, содержащим 10 мМ ЕДТА. Фракцию РНК с пришитыми белками выделяли центрифугированием в 5—20% сахарозном градиенте в роторе SW-40 при 35 000 об/мин в течение 17 ч при 4° , осаждали спиртом, растворяли в 8 М мочеvine и белки метили ¹²⁵I по описанной методике [6]. Избыток ¹²⁵I отделяли двукратным осаждением белков спиртом, осадок растворяли в 20 мкл буфера, содержащего 0,04 М трис- HCl (рН 7,5) и 0,04 М ЕДТА, добавляли панкреатическую РНКазу (4 мкг/1 OE_{260}), РНКазу T_1 (5 ед. акт/1 OE_{260}) и гидролизovali 18 ч при 37° . Раствор насыщали мочеvineй и после добавления белков-свидетелей наслаивали на гель. Двумерный электрофорез белков проводили по методу Меца и Богорада [12], модифицированному нами ранее [6]. В качестве контроля использовали необлученные препараты, с которыми проводили все остальные операции, как описано выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weissbach H., Ochoa S. (1976) Ann. Rev. Biochem., 45, 191—216.
2. Gualerzi C., Risuleo G., Pon C. L. (1977) Biochemistry, 16, 1684—1689.
3. Gualerzi C., Grandolfo M., Paradies H. H., Pon C. (1975) J. Mol. Biol., 95, 569—573.
4. Pon C., Gualerzi C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4950—4954.
5. Paradies H., Franz A., Pon C., Gualerzi C. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 59, 600—607.
6. Турчинский М. Ф., Броуде Н. Е., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Будовский Э. И. (1977) Биоорг. химия, 3, 1013—1020.
7. Броуде Н. Е., Турчинский М. Ф., Бони И. В., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Мухамеджанова Е. Н., Будовский Э. И., Шатский И. Н. (1977) Тезисы II Советско-французского симпозиума по взаимодействию нуклеиновых кислот с белками, Ташкент, 1977.

8. Eikenberry E. F., Bickle T. A., Traut R. R., Price C. A. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 113—116.
9. Zamir A., Miskin R., Vogel Z., Elson D. (1974) in: *Methods in Enzymology*, vol. XXX, part F, p. 406—426.
10. Wahba A. J., Miller M. J. (1974) in: *Methods in Enzymology*, vol. XXX, part F, p. 3—18.
11. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
12. Metz L. Y., Bogorad L. (1974) *Anal. Biochem.*, **57**, 200—210.

Поступило в редакцию
16.VIII.1978

**INITIATION FACTOR 3 INDUCED CHANGES IN THE RNA-PROTEIN
INTERACTIONS OF *E. COLI* 30S SUBUNIT**

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*

The cross-linking of proteins in the 30S subunit to 16S RNA under UV-irradiation has been studied in the presence or absence of the initiation factor 3 (IF3). In these two cases different proteins are cross-linked to 16S RNA, which is indicative of IF3 induced alterations in the RNA-protein contacts. This finding supports the earlier suggestion that IF3 causes conformational changes in the 30S subunit.
