



УДК 547.963.32.04

**КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ 30S СУБЧАСТИЦ РИБОСОМ  
*E. COLI*, ИНДУЦИРУЕМЫЕ ФАКТОРОМ ИНИЦИАЦИИ 3*****Бруде Н. Е., Кусова Е. С., Медведева Н. И.,  
Будовский Э. И.****Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Для изучения влияния фактора инициации 3 (IF3) на РНК-белковые взаимодействия в 30S субчастицах рибосом *E. coli* использован метод УФ-индуцированных сшивок. Проведено сравнение белков, образующих ковалентную сшивку с 16S РНК при УФ-облучении 30S субчастиц и комплекса 30S·IF3. Для идентификации пришитых белков применены два подхода: 1) фракцию пришитых белков метили  $^{125}\text{I}$ , 2) использовали 30S субчастицы, меченные  $^{32}\text{P}$ , и шитые белки идентифицировали по метке, содержащейся во фрагментах РНК, ковалентно связанных с белками после УФ-облучения. Оба метода показали значительную разницу в наборе белков, сшивающихся с 16S РНК в 30S субчастице и в комплексе 30S·IF3. Полученные результаты свидетельствуют о существенном изменении РНК-белковых контактов в 30S субчастице при присоединении фактора инициации 3.

Фактор инициации 3 (IF3) образует с 30S субчастицами рибосом *E. coli* стехиометрический комплекс 30S·IF3, который является промежуточным звеном при инициации синтеза белка на природных матрицах [1, 2]. Ряд данных говорит о том, что образование комплекса 30S·IF3 сопровождается изменением конформации 30S субчастиц. Группой Галерзи были обнаружены большие изменения в коэффициенте седиментации, вязкости, радиусе инерции и размерах комплекса по сравнению с нативной 30S субчастицей [3]. В другой работе этой же группы изменение кривых КД комплекса 30S·IF3 по сравнению со спектром 30S субчастиц в области 205–240 нм авторы интерпретировали как следствие изменения вторичной структуры белковой части рибосомных субчастиц [4]. С другой стороны, в работе Бодри и др. [5] не было обнаружено различий в радиусах инерции 30S субчастиц и комплекса 30S·IF3, на основании чего авторы сделали вывод о неизменности конформации 30S субчастиц после присоединения фактора инициации 3.

Веским свидетельством существования конформационных перестроек 30S субчастиц под действием фактора инициации 3 является изменение реакционной способности отдельных рибосомных белков в комплексе 30S·IF3 по сравнению с белками 30S субчастиц в реакции с N-этилмалеимидом [6] и иодом в присутствии β-лактопероксидазы [7].

Таким образом, совокупность имеющихся данных позволяет, по-видимому, говорить об изменении конформации 30S субчастицы, индуцированном фактором инициации 3, которое проявляется в белковой части рибосомной субчастицы.

С другой стороны, известно, что при взаимодействии 30S субчастицы с фактором инициации 3 основную роль играет 16S РНК субчастицы [8].

Рис. 1. Распределение  $^{125}\text{I}$ -метки при электрофорезе фактора инициации 3 в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

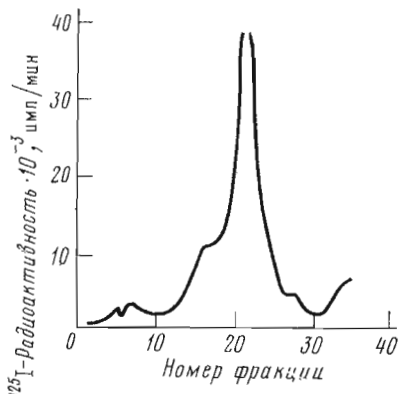


Рис. 2. Диссоциация 70S рибосом в присутствии IF3 (б) и  $^{125}\text{I}$ IF3 (в): 10Е (75 нмоль) 70S рибосом инкубировали с 6 мкг (276 нмоль) IF3 или  $^{125}\text{I}$ IF3 в 200 мкл стандартного буфера; а — контроль (без фактора). Смеси анализировали центрифугированием в 10–30% сахарозном градиенте (см. «Экспериментальную часть»)

Рис. 1

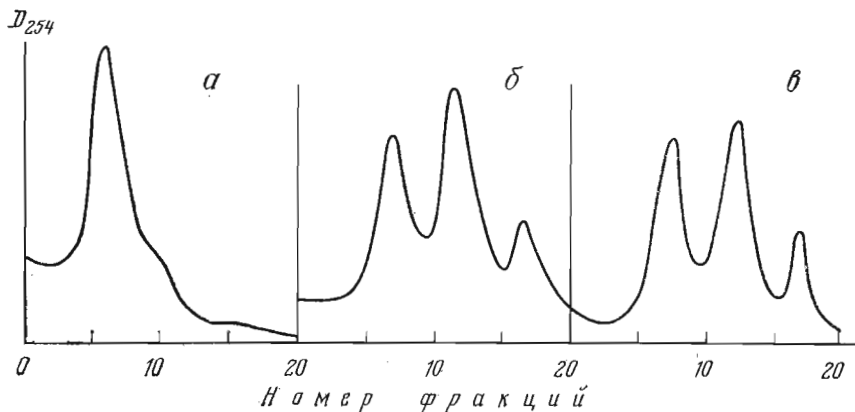


Рис. 2

Поэтому разумно предположить, что конформационное влияние фактора должно проявиться в изменении РНК-белковых контактов 30S субъединицы.

Для подтверждения этого предположения мы использовали метод УФ-индуцированных сшивок, позволяющий ковалентно связывать взаимодействующие звенья белков и нуклеиновых кислот [9]. Его эффективность была продемонстрирована на ряде нуклеопротеидов [10–12], в том числе и рибосом [13, 14].

В настоящей работе проведено сравнение белков, ковалентно связывающихся с 16S РНК при УФ-облучении нативной 30S субчастицы и комплекса 30S·IF3. Предварительное сообщение об этой работе было опубликовано [15].

Полученные препараты фактора инициации 3 охарактеризовывали по нескольким параметрам, а именно гомогенности, функциональной активности и отсутствию РНКазной активности.

Инкубация избыточного количества фактора с 30S субчастицами не приводила к деградации 16S РНК по данным центрифугирования в сахарозном градиенте в присутствии EDTA и додецилсульфата натрия, что указывало на отсутствие в его препаратах РНКазной активности.

Остальные характеристики фактора были получены на препаратах радиоактивно меченого белка. Судя по предварительным данным, введение тритиевой метки восстановительным оксиметилированием вызывало значительную потерю активности фактора инициации 3. Поэтому для введения метки мы использовали иодирование изотопом  $^{125}\text{I}$ . По модифици-

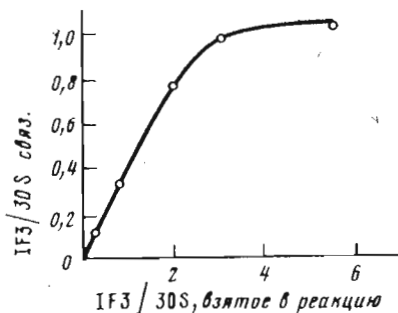


Рис. 3

Рис. 3. Связывание  $[^{125}\text{I}]\text{IF}_3$  с 30S субчастицами: 0,5  $\text{OE}_{260}$  (37,5 нмоль) 30S субчастиц инкубировали 15 мин при  $37^\circ\text{C}$  с 18,7–190 нмоль  $[^{125}\text{I}]\text{IF}_3$  в 75 мкл стандартного буфера. Смеси анализировали центрифугированием в 10–30% сахарозном градиенте

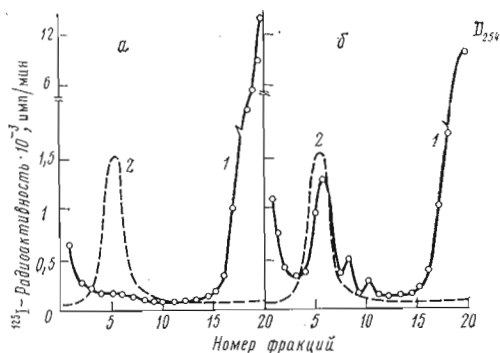


Рис. 4

Рис. 4. Ковалентное связывание  $[^{125}\text{I}]\text{IF}_3$  с 16S РНК в составе 30S субчастиц, индуцированное УФ-облучением (б); а – образец без облучения. 2  $\text{OE}_{260}$  30S субчастиц (150 нмоль) и 15 мкг  $[^{125}\text{I}]\text{IF}_3$  (690 нмоль) инкубировали 15 мин при  $37^\circ\text{C}$  в 200 мкл стандартного буфера, облучали УФ-светом 40 мин и центрифугировали в 5–20% градиенте сахарозы (условия облучения и последующей обработки см. «Экспериментальную часть»); 1 – анализ фракций по радиоактивности, 2 – по поглощению

рованному методу Бола [16] (0,75M трис-фосфат, pH 7,5;  $0^\circ\text{C}$ , 2 мин) были получены препараты белка с удельной радиоактивностью  $5 \cdot 10^8 - 10^9$  имп·мин $^{-1}$ ·мг $^{-1}$ . Результаты введения метки достаточно хорошо воспроизводимы. По данным гель-электрофореза в 10% акриламидном геле, чистота иодированных препаратов фактора составляла не менее 80% (рис. 1).

Функциональная активность меченого фактора была проверена по его антиассоциирующей способности, т. е. способности сдвигать равновесие, существующее в растворе рибосом  $70\text{S} \rightleftharpoons 50\text{S} + 30\text{S}$ , в сторону образования субчастиц [17]. По этому тесту препараты иодированного фактора сохраняют свою активность (рис. 2).

На рис. 3 представлена кривая насыщения при связывании  $[^{125}\text{I}]\text{IF}_3$  с 30S субчастицами. Из рисунка видно, что насыщение происходит при 3–4-кратном мольном избытке фактора инициации 3. При этом образуется комплекс, в котором компоненты находятся в эквимольном соотношении. Эти результаты согласуются с литературными данными по связыванию  $[^{35}\text{S}]\text{IF}_3$  с 30S субчастицей [1]. Данные по насыщению фиксированного количества  $[^{125}\text{I}]\text{IF}_3$  увеличивающимся количеством 30S субчастиц показали, что 70–75% иодированного фактора связывается с 30S субчастицами (эксперимент не приведен). Таким образом, выделенный фактор достаточно чист по данным гель-электрофореза, функционально активен по всем тестам, используемым для его характеристики, и не содержит примесной РНКазной активности. Введение радиоактивного иода практически не влияет на функциональную активность фактора.

УФ-облучение комплекса  $30\text{S} \cdot [^{125}\text{I}]\text{IF}_3$  приводит к увеличению количества метки, седиментирующей с 16S РНК в условиях полного разрушения как комплекса, так и 30S субчастиц. При дозе облучения  $1,2 \cdot 10^5$  кванта на субчастицу 20–30% фактора, содержащегося в комплексе, ковалентно связывается с 16S РНК (рис. 4).

Для идентификации белков, ковалентно связавшихся с 16S РНК при облучении 30S субчастиц или комплекса  $30\text{S} \cdot \text{IF}_3$ , были использованы рибосомы, меченные изотопом  $^{32}\text{P}$ . При УФ-облучении и последующем нуклеазном гидролизе таких частиц белки, образующие ковалентные сшивки с  $[^{32}\text{P}]$  РНК, оказываются маркированными радиоактивными фрагментами РНК, благодаря чему их можно идентифицировать.

Белки, ковалентно связывающиеся с 16S РНК при УФ-облучении  
30S субчастиц и комплекса 30S·IF3\*

Белки	30S				30S·IF3			
	<sup>32</sup> P		<sup>125</sup> I		<sup>32</sup> P		<sup>125</sup> I	
	ИМП/ /МИН <sup>2*</sup>	%	10 <sup>3</sup> ИМП/ /МИН <sup>3*</sup>	%	ИМП/ /МИН <sup>2*</sup>	%	10 <sup>3</sup> ИМП/ /МИН <sup>3*</sup>	%
S2	— 4*		—		74	4,5	5,12	3
S3	—		—		53	3	3	2
S4	—		4	3	219	12,5	13,74	8
S5	—		—		77	4,5	4	—
S6	—		—		3	—	7,58	4,5
S7	704	70	65	52	404	24	50,75	30,5
S8	—		—		131	8	5,63	3,5
S9,11 <sup>5*</sup>	28	3	3,2	2,5	220	13	10	6
S10	—		—		51	3	5,79	3,5
S12	—		—		50	3	2,21	1
S15-17 <sup>5*</sup>	100	10	22,6	18	150	8,5	15,6	9,5
S18-19 <sup>5*</sup>	169	17	30,6	24,5	200	13	33	20
S20-21								
IF3					60	3	14,5	8,5

\* Приведены абсолютная (имп/мин) и относительная (% от общей) радиоактивности участков геля, содержащих пришитые белки.

<sup>2\*</sup> Превышение над фоном, составляющим  $\leq 40$  имп/мин.

<sup>3\*</sup> Превышение над фоном, составляющим  $\leq 1000$  имп/мин.

<sup>4\*</sup> «—» — счет не превышал уровня фона.

<sup>5\*</sup> Соответствующие белки плохо разделяются в использованных условиях электрофореза.

В случае немеченых рибосом был использован другой прием, описанный нами ранее [14]. Фракцию белков, ковалентно связанных с 16S РНК в результате облучения, отделяли от непришившихся белков, метили радиоактивным иодом, РНК гидролизовали смесью РНКаз А и Т<sub>1</sub> и белки идентифицировали с помощью двумерного гель-электрофореза, как было описано ранее [14]. Белки, ковалентно связанные с короткими фрагментами РНК, двигаются медленнее свободных белков только в первом направлении (при кислых значениях рН), во втором направлении (система содержит додецилсульфат натрия) скорости движения свободных и сшитых белков одинаковы. Благодаря этому меченые белки регулярно сдвинуты относительно белков-свидетелей, что позволяет провести их предварительную идентификацию. Используемые подходы принципиально не сколько отличаются друг от друга. Действительно в опытах с <sup>32</sup>P радиоактивность каждого пятна определяется как количеством сшитого белка, так и размером фрагмента РНК, меченного <sup>32</sup>P, связанного с этим белком. В опытах же с <sup>125</sup>I именно количество белка является определяющим, так как метка вводится только в белок.

Из табл. 1 и рис. 5 видно, что в 30S субчастице основная часть радиоактивно меченого материала локализована в области, соответствующей белку S7; значительно меньшая — в области, соответствующей неразделенной смеси белков S15-17, S18-21, и совсем небольшие количества метки обнаружены в области белков S4 и S9,11. В случае комплекса 30S·IF3 радиоактивный материал обнаружен также в области белков S2, S3, S5, S6, S8, S10, S12 и IF3. Радиоактивность в белках S4 и S9,11 в комплексе 30S·IF3 значительно выше, чем в 30S субчастице.

Результаты, полученные при введении изотопов <sup>32</sup>P и <sup>125</sup>I, хорошо согласуются друг с другом. Можно отметить лишь некоторые количественные расхождения, не носящие принципиального характера.

Существенное различие между результатами, полученными с белками, меченными <sup>32</sup>P и <sup>125</sup>I, касается белков S5 и S6. В опытах с изотопом <sup>32</sup>P белок S5 был обнаружен во фракции белков, сшитых с фрагментами РНК,

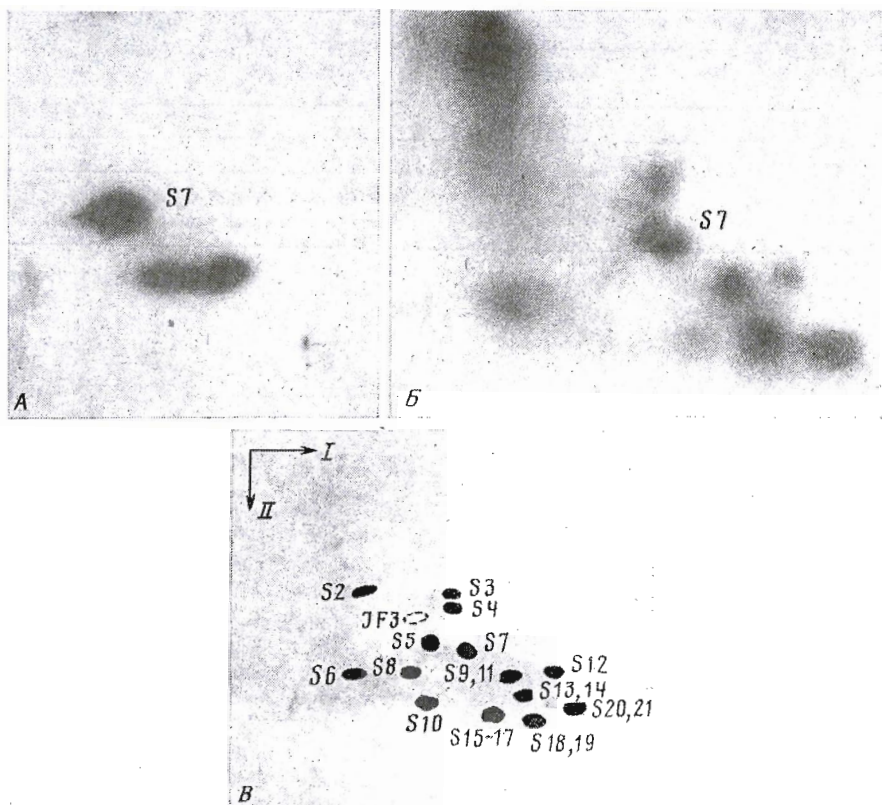


Рис. 5. Радиоавтограммы, полученные при двумерном электрофорезе иодированных белков, выделенных из нуклеазного гидролизата облученных 30S субчастиц (а) и облученного комплекса 30S-IF3 (б); в — схема расположения белков 30S субчастиц при электрофорезе. На радиоавтограммах для ориентира показано положение иодированного белка S7

в то время как в аналогичном опыте с изотопом  $^{125}\text{I}$  этот белок идентифицировать не удалось. Это, вероятно, связано с трудностью идентификации меченых белков, несущих фрагменты РНК на двумерных гелях. В случае иодированных белков пятна на радиоавтограммах получаются более диффузными, чем в случае белков, меченных  $^{32}\text{P}$ , и нельзя исключить перекрытия белков S5 и S7, поскольку они расположены на одной горизонтали. Сшитый белок S6 был, напротив, обнаружен лишь в случае иодированных белков, выделенных из комплекса 30S-IF3. Приведенные в этой статье количественные данные по иодированным белкам, сшивающимся в составе нативной 30S субчастицы, несколько отличаются от данных предварительного сообщения [15]. Расхождения, однако, не носят принципиального характера и объясняются, вероятно, использованием разных методов иодирования белков с пришитыми фрагментами РНК и несколько различающимися препаратами 30S субчастиц.

Использованный нами метод двумерного геля-электрофореза для идентификации пришитых белков, к сожалению, не позволяет сделать выводов относительно белка S1, которому приписывается большая роль в инициации трансляции природных матриц (см., например, [18]). Этот белок расположен на электрофореграммах близко от старта, где всегда обнаруживается фоновая радиоактивность. В нашей лаборатории, однако, специальными опытами было показано, что белок S1 не сшивается с 16S РНК в составе 30S субчастицы ни в присутствии, ни в отсутствие IF3\*.

\* Данные будут опубликованы в одном из следующих выпусков журнала.

Таблица 2

Агент	Рибосомные белки, меняющие реакционную способность в присутствии IF3	Ссылка
УФ-облучение N-Этилмалеимид Иодирование	S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9,11, S10, S12 S1, S4, S11, S12, S18, S21 S2, S5, S8, S11, S17	[6] [7]
Агент	Белки-«соседи» IF3	Ссылка
Бифункциональные агенты, дающие белок-белковые сшивки	S1, S7, S11, S12, S13, S19, и S21	[23-25]

Давно существует предположение о том, что различные этапы трансляции сопровождаются изменением конформации рибосомных субъединиц [19, 20]. Это представление, однако, настолько общо и так трудно доказуемо экспериментально, что до сих пор остается лишь предположением.

Если изменение конформации рибосомного нуклеопротеида вызывается или сопровождается изменением РНК-белковых взаимодействий, то такие изменения могут быть обнаружены методом УФ-индуцированных сшивок. Действительно, в случае исчезновения контакта данного белка (или, наоборот, появления нового контакта) сравнение сшитых белков на двух различных этапах трансляции должно показать, что переход от одного этапа к другому сопровождается изменением взаимодействия данного белка с РНК. Используемый подход не дает ответа на вопрос о сохранении или изменении контактов данного белка, если этот белок обнаруживается в обеих исследованных системах. Для решения этого вопроса необходимо определение первичной структуры взаимодействующих фрагментов РНК и белка.

Результаты, полученные в настоящей работе методом УФ-индуцированных сшивок, свидетельствуют, что в 30S субчастице по крайней мере контакты белков S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9,11, S10 и S12 с 16S РНК меняются при образовании комплекса с фактором инициации 3.

Изменение контактов 16S РНК с большим количеством белков в комплексе 30S·IF3 можно сопоставить с некоторыми экспериментальными данными. Показано, например, что фактор инициации 3 взаимодействует с 16S РНК по крайней мере в двух удаленных друг от друга областях (3'- и 5'-концы) [21]. Пока трудно сказать, сконцентрированы ли эти места взаимодействия фактора с 16S РНК в одной точке 30S субчастицы или находятся на расстоянии друг от друга. Однако в любом случае присоединение фактора инициации 3 к 30S субчастице вызывает, по-видимому, перестройку значительной части 16S РНК.

Сопоставление белков, контакты которых с 16S РНК изменились в присутствии фактора по тесту УФ-индуцированных сшивок, с белками, изменявшими свою чувствительность к N-этилмалеимиду и иодированию, позволяет отметить некоторые закономерности (см. табл. 2).

Во-первых, все три метода дают большое количество общих белков, меняющих свою реакционную способность в присутствии фактора инициации 3. Это белки S2, S4, S5, S8, S11 и S12, которые реагируют на него по крайней мере по двум тестам. Во-вторых, несмотря на широкий круг белков, чувствительных к присутствию фактора, среди них нет белков группы S7, связанных, как известно, с 3'-концевым фрагментом 16S РНК [22]. Эти белки, однако, обнаружены среди белков, дающих с фактором инициации 3 белок-белковую сшивку (см. табл. 2) и расположенных, следовательно, вблизи места посадки фактора на поверхность 30S



субчастицы. В-третьих, среди белков, изменивших свои контакты в присутствии фактора инициации 3, обнаруживаются белки S4 и S5, которых нет в «соседях» фактора и для которых известно, что они важны для трансляции матрицы. Действительно, белки S4 и S5 вместе с белками S11 и S12 относятся к группе «точности трансляции» [26, 27].

Таким образом, проведенный анализ показывает, что область связывания фактора инициации 3 и область его конформационного влияния, по крайней мере частично, не совпадают. Присоединение фактора к 30S субчастице вызывает существенную конформационную перестройку, которая затрагивает область, необходимую для правильной трансляции матрицы.

### Экспериментальная часть

30S субчастицы выделяли из рибосом *E. coli* MRE600, дважды промытых 1 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , зональным центрифугированием [28] в роторе Ti 15 на центрифуге Beckman L5-50, активировали по Замир и др. [29], осаждали спиртом и хранили при  $-10^\circ\text{C}$ .

$^{32}\text{P}$  30S субчастицы были выделены А. Р. Пивазяном и М. Ф. Турчинским из рибосом, выращенных на среде с низким содержанием фосфата в присутствии  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  (1–2 мКи/10 мл).

Фактор инициации 3 выделяли из промыток рибосом 1 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$  по методу Вабы и Миллера [30]. В некоторых случаях фактор подвергали дополнительной очистке на фосфоцеллюлозе P-11. Препараты белка хранили в 0,75 М трис-фосфате (рН 7,5) с 10% глицерином при  $-10^\circ\text{C}$ .

Гомогенность полученных препаратов фактора проверяли с помощью гель-электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [31]. Меченый фактор (1 мкг,  $5 \cdot 10^5$  имп/мин) наносили на трубку с гелем, электрофорез проводили в натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, при токе 8 мА/трубка. Гель извлекали из трубки и разрезали на 35–40 фракций на приборе фирмы Savant Instrument Inc. (США). Радиоактивность просчитывали на гамма-счетчике фирмы Intertechnique (Франция) (см. рис. 1).

Активность фактора тестировали по его антиассоциирующей активности и по его способности стимулировать включение фенилаланина в бесклеточной системе в присутствии poly(U) [30]. Количественную оценку активности проводили по связыванию иодированного фактора с 30S субчастицами (см. ниже).

Для проверки нуклеазной активности фактора его 6–8-кратный мольный избыток инкубировали с 30S субчастицами в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ , субчастицы разрушали добавлением додецилсульфата натрия и EDTA и анализировали целостность 16S РНК центрифугированием в градиенте концентрации сахаразы (см. ниже анализ облученного комплекса 30S·IF3).

Иодирование белка проводили в растворе 0,75 М трис-фосфата (рН 7,5) по модифицированному методу Бола [16] в присутствии хлористого иода. Раствор ICl (0,02 М) непосредственно перед мечением разводили (1:10) 0,12 М раствором триса. К разбавленному раствору ICl добавляли 0,1–0,5 мКи  $\text{Na}^{125}\text{I}$  в щелочном растворе без носителя (Amersham, 18 мКи/мкг, Англия). Полученным раствором иодировали 25–30 мкг белка при  $0^\circ\text{C}$  в течение 2 мин. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл  $\beta$ -меркаптоэтанола. Избыток метки удаляли диализом.

Комплекс 30S·IF3 и 30S· $^{125}\text{I}$ IF3 получали в буфере, содержащем 10 мМ трис·HCl (рН 7,8), 8 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол (стандартный буфер). В 200 мкл содержалось 1–5  $\text{OE}_{260}$  30S субчастиц и 6–8-кратный мольный избыток фактора. Смесь инкубировали 15 мин при  $37^\circ\text{C}$ , а затем отделяли комплекс от свободного белка центрифугированием в 10–30% сахарозном градиенте, приготовленном на том же буфере (ротор SW-50.1, 45 000 об/мин, 150 мин). Градиент раскапыва-

ли через проточный денситометр (TZ 24S, Чехословакия), во фракциях определяли радиоактивность. Фракции, поглощающие при 254 нм и содержащие радиоактивность, объединяли и осаждали комплекс 0,7 объемами спирта.

УФ-облучение 30S субчастиц выделенного комплекса 30S·IF3 или смеси субчастиц с избытком фактора проводили в стеклянных силиконизированных стаканчиках с перемешиванием и охлаждением до 0° С 40 мин светом от двух ртутных ламп (15 Вт) низкого давления (световой поток  $2,5 \cdot 10^{17}$  квант/мин<sup>-1</sup>/см<sup>2</sup>, поглощенная энергия  $4,2 \cdot 10^5$  квант/субчастица).

Анализ облученного комплекса 30S·IF3, содержащего иодированный фактор, проводили, добавляя к контрольному и облученному образцам додецилсульфат натрия до 1% и EDTA до 10 мМ. Смесь наслаивали на 5–20% сахарозный градиент, приготовленный на 10 мМ трис·НСl (рН 7,4), 0,1% додецилсульфате натрия и 10 мМ EDTA, и центрифугировали 17 ч при 35 000 об/мин и 4° С. Градиент раскапывали на ~20 фракций, в которых определяли радиоактивность и поглощение (см. рис. 4).

Анализ белков, ковалентно связывающихся с 16S РНК при УФ-облучении комплекса 30S·IF3 и 30S субчастиц. Облученные препараты, содержащие [<sup>32</sup>P]30S, осаждали спиртом, растворяли в 20 мкл буфера 0,04 М трис·НСl (рН 7,2) с 0,04 М EDTA, добавляли панкреатическую РНКазу (4 мкг на 10Е<sub>260</sub>), РНКазу Т<sub>1</sub> (5 ед. акт. на 10Е<sub>260</sub>), мочевины до 2 М и гидролизовали 18 ч при 37° С. Раствор насыщали мочевиной, добавляли белки-свидетели и наслаивали на гель. Двумерный гель-электрофорез белков проводили по методу Метца и Богорада [32], модифицированному нами ранее [14]. Гели прокрашивали кумасси бриллиантовым синим, запаивали в полиэтиленовую пленку и экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-1 (Шосткинское объединение Свема). Участки геля, содержащие радиоактивность, вырезали и просчитывали в сцинтиллаторе Unisolv (Koch-Light Lab.).

Немеченый комплекс 30S·IF3 после облучения разрушали добавлением додецилсульфата натрия до концентрации 1% и EDTA до концентрации 10 мМ. Фракцию РНК с пришитыми белками выделяли центрифугированием в 5–20% сахарозном градиенте в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия, как это описано выше. РНК с пришитыми белками осаждали спиртом, растворяли в 0,1 М трис·НСl (рН 7,85) с 0,05 М хлорамином Т. Белки метили <sup>125</sup>I по методу Хантера и Гринвуда [33] при 20° С в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением меркаптоэтанола. Далее пробы гидролизовали смесью РНКаз и проводили электрофорез, как описано выше. 30S субчастицы подвергали тем же операциям, что и комплекс 30S·IF3.

Авторы благодарят М. Ф. Турчинского и А. Д. Пивазяна за выделение рибосом, меченных изотопом <sup>32</sup>P.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sabol S., Ochoa S. (1971) *Nature New Biol.*, 234, 233–236.
2. Revel M. (1977) in: *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* (Weissbach H., Pestka S., eds), pp. 245–321, Acad. Press, N. Y.
3. Paradies H. H., Franz A., Pon C. L., Gualerzi C. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 59, 600–607.
4. Gualerzi C., Grandolfo M., Paradies H. H., Pon C. (1975) *J. Mol. Biol.*, 95, 569–573.
5. Beaudry P., Petersen H. U., Grunberg-Manago M., Jacrot B. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 72, 321–397.
6. Ewald R., Pon C., Gualerzi C. (1976) *Biochemistry*, 15, 4786–4791.
7. Michalsky C. J., Sells B. H., Wahba A. J. (1976) *FEBS Lett.*, 71, 347–350.
8. Pon C., Gualerzi C. (1976) *Biochemistry*, 15, 804–811.
9. Smith K. C. (1976) in: *Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology* (Smith K. C., ed.), pp. 67–83, Plenum Press, London — N. Y.
10. Budowsky E. I., Simukova N. A., Turchinsky M. F., Boni I. V., Skoblov Y. S. (1975) *Nucl. Acids Res.*, 3, 261–276.



11. Budzik G. P., Zan S. S. M., Shoemaker M. U. P., Shimmel P. R. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4433—4439.
12. Markovits A. (1972) *Biochem. et biophys. acta*, **281**, 522—534.
13. Möller K., Brimacombe R. (1975) *Molec. Gen. Genet.*, **141**, 343—355.
14. Турчинский М. Ф., Броуде Н. Е., Кусова К. С., Абдурашидова Г. Г., Будовский Э. И. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1013—1020.
15. Броуде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 1687—1689.
16. Ball W. F., Helmkamp R. W., Dawis T. P., Izzo M. I., Goodland R. Z., Contreras M. A., Spar Y. Z. (1966) *Proc. Soc. Exptl Biol. and Med.*, **122**, 407—414.
17. Sabol S., Meier D., Ochoa S. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **33**, 332—340.
18. Van Dieijen G., Van der Laken C. J., Van Knippenberg P. H., Van Duin J. (1975) *J. Mol. Biol.*, **93**, 351—366.
19. Bretscher M. (1968) *Nature (London)*, **218**, 675—677.
20. Nishizuka Y., Lipmann F. (1966) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **116**, 344—351.
21. Pon C. L., Brimacombe R., Gualerzi C. (1977) *Biochemistry*, **16**, 5681—5686.
22. Yuki A., Brimacombe R. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **56**, 23—34.
23. Van Duin J., Kurland C. G., Dondon J., Grunberg-Manago M. (1975) *FEBS Lett.*, **59**, 287—304.
24. Hawley D. A., Slobin L., Wahba A. J. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **61**, 544—550.
25. Heimark R. L., Kahan L., Johnston K., Hershey J. W. B., Traut R. R. (1976) *J. Mol. Biol.*, **105**, 219—230.
26. Pongs O., Nierhaus K. H., Erdmann V. A., Wittmann H. G. (1974) *FEBS Lett.*, **40**, 328—337.
27. Wittmann H. G., Wittmann-Liebold B. (1974) in: *Ribosomes (Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds)*, pp. 115—140, Cold Spring Harbor Lab., N. Y.
28. Eikenberry E. F., Bickle T. A., Traut R. R., Price C. A. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 113—116.
29. Zamir A., Miskin R., Vogel Z., Elson D. (1974) in: *Meth. Enz.*, v. XXX, part. F, pp. 406—426.
30. Wahba A. J., Miller M. J. (1974) in: *Meth. Enz.*, v. XXX, part F, pp. 3—18.
31. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
32. Metz L. Y., Bogorad L. (1974) *Anal. Biochem.*, **57**, 200—201.
33. Hunter W. M., Greenwood F. C. (1964) *Biochem.*, **91**, 43—56.

Поступила в редакцию  
20.II.1979

### CONFORMATIONAL CHANGES OF 30S SUBUNITS OF *E. coli* RIBOSOMES INDUCED BY INITIATION FACTOR 3

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

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

The cross-linking of proteins of the 30S subparticle to 16S RNA under UV-irradiation (254 nm) has been studied in the presence and absence of initiation factor 3 (IF3). The following two approaches have been applied: 1) cross-linked proteins have been labeled with radioactive iodine  $^{125}\text{I}$ , 2) [ $^{32}\text{P}$ ]-labeled 30S subunits have been used and after irradiation cross-linked proteins have been detected by a label in the RNA fragments covalently bound to them. Both methods have revealed a marked difference in the pattern of proteins cross-linked to 16S RNA in 30S subparticle and in the 30S-IF3 complex, thus providing evidence for alterations in the RNA-protein contacts induced by IF3.