



УДК 547.963.32.04

ПРИРОДА УЧАСТКА 30S СУБЧАСТИЦЫ РИБОСОМ *E. coli*,  
СВЯЗЫВАЮЩЕГО РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК S1

Златкин И. В., Воин И. В., Будовский Э. Ш.

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

Рибосомный белок S1 участвует в процессе узнавания и связывания 30S субчастицей рибосом природной мРНК на первых этапах инициации белкового синтеза [1—4], а также, по-видимому, играет важную роль в процессе элонгации [5]. Молекулярные основы функционирования белка S1 пока неясны. В частности, существует неопределенность в вопросе о природе его взаимодействий с 30S субчастицей. Наличие у белка S1 двух полинуклеотидсвязывающих центров различной специфичности [6, 7] дает основание предполагать, что один из них вовлечен во взаимодействие с 16S РНК в составе 30S субчастицы, а другой — в связывании мРНК (гипотеза Драпера и фон Хинпеля [7, 8]). С другой стороны, имеются данные, что в формировании S1-связывающего участка на 30S субчастице активную роль играют рибосомные белки [9]. Для понимания роли белка S1 в трансляции важно решить, определяется ли его взаимодействие с 30S субчастицей совокупностью РНК-белковых и белок-белковых взаимодействий или же только последними.

Ранее мы показали, что при УФ-облучении ( $\lambda$  254 нм) 30S субчастиц не происходит ковалентного пришивания белка S1 к 16S РНК и что связывание S1 с 30S субчастицей не уменьшается в присутствии избытка олигодезоксинуклеотидов [10]. Это поставило под сомнение участие какого-либо из полинуклеотидсвязывающих центров S1 во взаимодействии со свободной 30S субчастицей. Для выяснения природы этого взаимодействия мы в настоящей работе оценили влияние на ассоциацию белка S1 с 30S (—S1) субчастицей\* избирательного расщепления поверхностных участков РНК и белков, используя рибонуклеазу А для гидролиза односторонних участков 16S РНК [11], эндонуклеазу из яда кобры для гидролиза двухспиральных областей 16S РНК [12] и трипсин для гидролиза белковой поверхности 30S субчастиц [13]. Аналогичный подход ранее был применен для исследования природы участка связывания инициаторного фактора 3 [13].

Методы получения 30S (—S1) субчастиц, гомогенного препарата S1 и меченая белка *in vitro*  $^{125}\text{I}$  описаны в предыдущей работе [10]. Перед использованием 30S (—S1) субчастицы активировали прогреванием в буфере с 20 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  [14] и очищали от агрегатов центрифугированием в

\* 30S(—S1) субчастицы — 30S субчастицы, лишённые белка S1.

5—20% сахарозном градиенте в этом же буфере. В использованных нами условиях обработки ферментами (см. «Экспериментальную часть») 30S субчастицы сохраняли свои седиментационные характеристики; следовательно, отщепление пептидных и нуклеотидных фрагментов действительно происходит с «поверхности» 30S субчастиц и не затрагивает их макроструктуры. При изучении влияния нуклеазного гидролиза на связывание  $[^{125}\text{I}]\text{S1}$  в качестве контроля использовали не обработанные РНКазами препараты. В случае трипсиновой обработки к контрольной пробе добавляли сначала ингибитор, затем трипсин. Связывание  $[^{125}\text{I}]\text{S1}$  с контрольными препаратами 30S субчастиц принимали за 100%. Степень нуклеазного гидролиза оценивали по количеству олигонуклеотидов на вершине градиента (см. «Экспериментальную часть»)

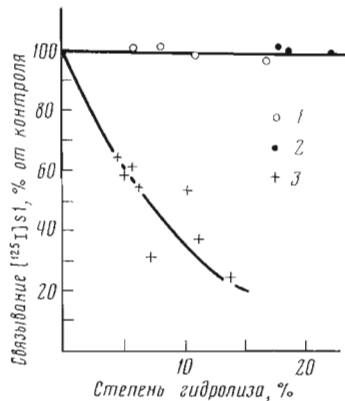
или в параллельных опытах по поглощению супернатанта после осаждения гидролизовавшихся рибосом спиртом [41]. Степень трипсинового гидролиза определяли по количеству пептидов на вершине градиента, используя метод Лоури [45]. В опытах с трипсином результаты по связыванию  $[^{125}\text{I}]\text{S1}$  не зависели от того, добавлялся ли белок непосредственно в инкубационную смесь или к предварительно очищенным от трипсина, ингибитора и продуктов гидролиза 30S субчастицам (рисунок).

Как видно из рисунка, удаление до 20% нуклеотидного материала из одноплетневых (под действием РНКазы А) или двухспиральных (под действием РНКазы из яда кобры) участков 16S РНК не приводит к изменению степени связывания белка S1 по сравнению с контролем. Добавление в контрольную инкубационную смесь ауридинтрикарбоновой кислоты ( $10^{-5}$ — $10^{-4}$  М), известного ингибитора связывания S1 с полинуклеотидами [46—48], также не вызывало изменения степени связывания S1. В то же время трипсиновый гидролиз открытых участков рибосомных белков, т. е. изменение белковой поверхности 30S субчастиц, влечет за собой резкое уменьшение связывания белка S1 (см. рисунок). Таким образом, именно рибосомные белки, а не поверхностные участки 16S РНК определяют способность 30S субчастиц к взаимодействию с белком S1.

Суммируя результаты данной и предыдущей работ [10], мы приходим к выводу, что в свободной 30S субчастице белок S1 связан за счет белок-белковых взаимодействий. В таком случае оба его полинуклеотидсвязывающих участка остаются незанятыми, т. е. потенциально свободны для участия в связывании мРНК или тРНК на разных этапах трансляции.

### Экспериментальная часть

К 1—2  $\text{OE}_{260}$  активированных 30S (—S1) субчастиц в 50—100 мкл буфера для связывания (15 мМ трис-НСl, рН 7,7; 70 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 7 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,1 мМ дитиотреит) добавляли от 5 до 25 мкл на 1  $\text{OE}_{260}$  раствора РНКазы А (Calbiochem, 20 мкг/мл) или от 5 до 20 мкл на 1  $\text{OE}_{260}$  раствора эндонуклеазы из яда кобры (250 ед. акт./мл), объем проб выравнивали буфером, пробы инкубировали 30 мин при 25° С, затем еще 10 мин с 5—10 мкл раствора  $[^{125}\text{I}]\text{S1}$  (500—1000 мкг/мл, 50 000—100 000 нмн/мин/мкг) и центрифугировали в 5—20% сахарозном градиенте на буфере для связывания (ротор SW-50.1; 42 000 об/мин, 2,5 ч, или ротор SW-40; 22 000 об/мин, 17 ч, 4° С). При обработке трипсином добавляли от 0,05 до 0,5 мкг трипсина на 1  $\text{OE}_{260}$  (трипсин TPCK, Worthington) и после 20 мин при 37° С



Зависимость связывания  $[^{125}\text{I}]\text{S1}$  с 30S (—S1) субчастицами, обработанными РНКазой А (1), эндонуклеазой из яда кобры (2) и трипсином (3), от степени гидролиза

добавляли соевый ингибитор (Soy bean inhibitor, Calbiochem), через 3—5 мин добавляли [ $^{125}\text{I}$ ]S1, инкубировали и центрифугировали, как указано выше. Градиенты раскапывали на фракции, используя проточный спектрофотометр VD CSAV (ЧССР),  $^{125}\text{I}$ -радиоактивность определяли в CG-30 гамма-спектрометре (Intertechnique, France). Степень связывания белка с препаратами 30S (—S1) субчастиц оценивали по соотношению радиоактивности в пике 30S и на вершине градиента. Степень гидролиза определяли как отношение количества отщепленного при гидролизе олигонуклеотидного или олигонентридного материала к общему содержанию этого материала в исследуемой пробе.

Авторы искренне благодарят С. К. Василенко за предоставление фермента эндонуклеазы из яда кобры *Naja oxiana*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Sher W., Leffler S. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 3611—3615.
2. Van Dieijen G., Van Knippenberg P. H., Van Duin J. (1976) Eur. J. Biochem., **64**, 511—518.
3. Van Dieijen G., Zipori P., Van Prooijen W., Van Duin J. (1978) Eur. J. Biochem., **90**, 571—580.
4. Steitz J. A., Walba A. J., Laughrea M., Moore P. B. (1977) Nucl. Acids Res., **4**, 1—15.
5. Linde R., Quoc Khanh N., Lipecky R., Gassen H. G. (1979) Eur. J. Biochem., **93**, 565—572.
6. Draper D. E., von Hippel P. H. (1978) J. Mol. Biol., **122**, 321—338.
7. Draper D. E., von Hippel P. H. (1978) J. Mol. Biol., **122**, 339—359.
8. Draper D. E., von Hippel P. H. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **76**, 1040—1044.
9. Laughrea M., Moore P. B. (1978) J. Mol. Biol., **122**, 109—112.
10. Бонн И. В., Златкин И. В., Будовский Э. И. (1979) Биоорг. химия, **5**, 1633—1641.
11. Терещина Н. Л., Копылов А. М., Богданов А. А. (1978) Биохимия, **43**, 229—234.
12. Carbon Ph., Ehresmann Ch., Ehresmann B., Ebel J.-P. (1979) Eur. J. Biochem., **100**, 399—410.
13. Gualerzi C., Pon C. L. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **52**, 792—799.
14. Zamir A., Miskin R., Elson D. (1971) J. Mol. Biol., **60**, 347—364.
15. Lowry O., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265—275.
16. Tal M., Aviram M., Kanarek A., Weiss A. (1972) Biochim. et biophys. acta, **281**, 381—392.
17. Li P. T., Shea T., Ellis S., Conway T. W. (1979) Eur. J. Biochem., **98**, 155—163.
18. Dahlberg A. E., Dahlberg J. E. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 2940—2944.

Поступило в редакцию  
14.XII.1979

#### NATURE OF THE *E. COLI* 30S RIBOSOMAL SUBUNIT BINDING SITE FOR PROTEIN S1

ZLATKIN I. V., BONI I. V., BUDOWSKY E. I.

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

The 30S subunits lacking protein S1 were treated with RNase A or cobra venom endonuclease to hydrolyse the open single or double-stranded 16S RNA regions, respectively. Under conditions used, the 30S(—S1) particles lost about 10-20% of the total nucleotide material but retained their sedimentation characteristics and ability to bind S1 with the same affinity. The S1 binding was also insensitive to aurintricarboxylic acid, a strong inhibitor of complex formation between S1 and polynucleotides. On the other hand, a controlled trypsin digestion of the 30S(—S1) particles resulted in the decrease of their S1 binding activity. These results suggest that it is ribosomal proteins rather than the 16S RNA segments which provide the binding site for S1. Thus protein S1 appears to associate with 30S subunit by means of protein-protein interactions.