



УДК 577.217.344.088:577.113.6

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ РИБОСОМ *E. COLI* АНАЛОГОМ мРНК — ПРОИЗВОДНЫМ 5'-ТРИФОСФАТА ГЕНТАУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫГимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Комарова Н. И.,
Фролова С. Б.Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Получены 5'-[β , γ - ^{32}P]трифосфаты олигоуридилатов и исследована аффинная модификация мРНК-связывающего центра рибосом *E. coli* [^{32}P]pppU(pU)₆ при действии N-циклогексил-N'- β -(4-метилморфолинио)этилкарбодимид. Показано, что реакция фосфорилирования рибосом производным pppU(pU)₆ заканчивается через 5 мин. Около 20% pppU(pU)₆, связавшегося в тройной комплекс, ковалентно присоединяется к рибосомам. Модификации подвергаются 30S и 50S рибосомные субчастицы; степень модификации 30S субчастиц в 2 раза превышает степень модификации 50S. Идентифицированы рибосомные белки, подвергающиеся специфичному фосфорилированию трифосфатом pppU(pU)₆: S4, S5, S9, L2. Фосфорилирование рибосомных РНК с помощью pppU(pU)₆ практически не наблюдалось.

Ранее для исследования компонентов мРНК-связывающего центра рибосом *E. coli* использовали алкилирующие производные олигоуридилатов, содержащие ароматическую 2-хлорэтиламиногруппу (длина фрагмента, включающего в себя активную функцию, 9–10 Å) либо на 3'-, либо на 5'-конце [1, 2]. Время полупревращения 2-хлорэтиламиногруппы в активную промежуточную частицу (этилениммониевый катион) составляет 9–12 ч при 25°С [3, 4]. В процессе такого длительного алкилирования происходила частичная диссоциация тройного комплекса [1, 2]. Поэтому представлялось более перспективным использовать быстро реагирующие аналоги матрицы с гораздо меньшей по размерам модифицирующей группой. Ранее в работе [5] был предложен метод получения нерадиоактивных 5'-трифосфатов олигорибонуклеотидов и показана способность трифосфата триуридилата служить матрицей при образовании специфического тройного комплекса рибосома · pppU(pU)₂ · [^{14}C]Phe-тРНК. С другой стороны, известно, что при действии СМЕС в водном растворе на 5'-концевые трифосфатные группы моно- и полинуклеотидов образуются высокореакционноспособные фосфорилирующие соединения — циклические замещенные триметафосфаты [6–8]. Основные реакции, протекающие при активации трифосфатной группы в водной среде, описаны ранее [9].

В настоящей работе были получены 5'-[β , γ - ^{32}P]трифосфаты тетра-, гепта- и нонауридилатов и исследована аффинная модификация мРНК-связывающего центра рибосом *E. coli* [^{32}P]pppU(pU)₆ при действии СМЕС.

Ацетилованные по 2'-оксигруппе рибозы октауридилаты получали по методу [10]. Содержание ацетильных групп в полученном препарате, оцененное по гидроксамовой реакции, составляло 100% от теоретически возможного. Активацию 5'-концевого фосфата в ацетилированных олигоуридилатах проводили с помощью ДСС по методу [5]. 5'-Трифосфаты олигоуридилатов получали обработкой реакционной смеси, содержащей ДСС и ацетилированный олигонуклеотид, бис(три-*n*-бутиламмоний)-[^{32}P]пирофосфатом по методу [5]. Степень превращения контролировали ионообменной микроколоночной хроматографией после предварительной обработки продуктов фосфорилирования 25% водным аммиаком при 50°С для

Принятые сокращения: СМЕС — N-циклогексил-N'- β -(4-метилморфолинио)этилкарбодимид; ДСС — N,N'-дидиклогексилкарбодимид; DMF — диметилформамид.

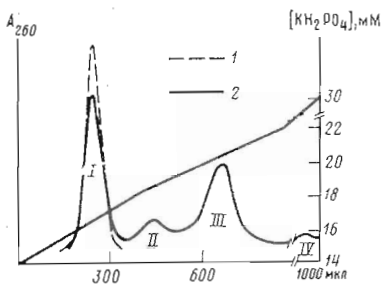


Рис. 1

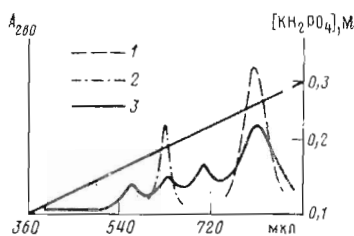


Рис. 2

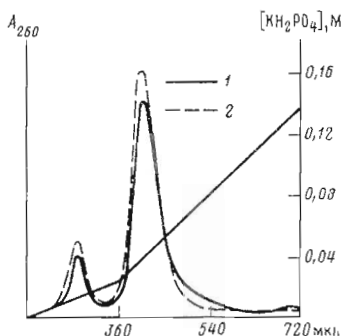


Рис. 3

Рис. 1. Микроколоночная хроматография $(pU)_9$ (1) и продуктов фосфорилирования $(pU)_9$ $[^{32}P]$ пирофосфатом (2); I – $(pU)_9$, II – $ppU(pU)_8$, III – $pppU(pU)_8$, IV – полифосфаты

Рис. 2. Микроколоночная хроматография $pppU(pU)_8$ (1), $(pU)_9$ (2) и продуктов частичного гидролиза $pppU(pU)_8$ (3) фосфомоноэстеразой

Рис. 3. Микроколоночная хроматография продуктов гидролиза $pppU(pU)_8$ (1) и исходного $(pU)_9$ (2) фосфомоноэстеразой и пиримидил-РНКазой

снятия ацетильных защитных групп. На рис. 1 приведен результат микроколоночной хроматографии продуктов фосфорилирования $(pU)_9$. Доказательством того, что продукт, полученный с выходом 30%, имеет 5'-концевую трифосфатную группу, служит результат ионообменной микроколоночной хроматографии его частичного фосфомоноэстеразного гидролизата (рис. 2). При анализе обнаружены пики, соответствующие продуктам последовательного дефосфорилирования $pppU(pU)_8$. В отличие от описанной в работе [5] методики синтеза 5'-трифосфатов олигоуридилатов, меченных ^{32}P , проводили с количествами исходных веществ, на порядок меньшими.

Поскольку снятие ацетильных защит осуществляли путем обработки продукта фосфорилирования 25% водным аммиаком при $50^\circ C$, можно было ожидать образования циклических фосфотриэфиров, расщепление которых приводит к изомеризации фосфодиэфирных связей [11, 12]. Для обнаружения возможных (2'-5')-фосфодиэфирных связей трифосфат $pppU(pU)_8$ обрабатывали фосфомоноэстеразой для разрушения трифосфатной группы и РНКазой А в условиях исчерпывающего гидролиза. Анализ гидролизата методом микроколоночной хроматографии показывает, что дефосфорилированный нонауридилат практически полностью гидролизуется РНКазой А (рис. 3), т. е. использованный метод позволяет получать трифосфаты олигоуридилатов без изомеризации фосфодиэфирных связей. Выход $[^{32}P]$ трифосфатов тетра-, гекса- и нонауридилатов после выделения микроколоночной хроматографией и последующей гель-фильтрации составляет $\sim 25\%$ в расчете на исходный олигонуклеотид.

Данные по стимулирующему действию $pppU(pU)_{n-1}$ (с $n=4, 7$ и 9) на связывание $[^{14}C]Phe-tRNK^{Phe}$ с рибосомами *E. coli* приведены в табл. 1. Видно, что в соответствии с работой [5] наличие трифосфатной группы у олигоуридилата не препятствует его взаимодействию с $Phe-tRNK^{Phe}$ и рибосомами. Степень связывания $[^{32}P]pppU(pU)_{n-1}$ ($n=4, 7$ и 9) в тройной комплекс с рибосомами и $tRNK^{Phe}$ при $0^\circ C$ составляет $0,3-0,6$ моль $[^{32}P]pppU(pU)_{n-1}$ на 1 моль рибосом при насыщающих концентрациях $pppU(pU)_{n-1}$ (1 мМ) и совпадает со степенью связывания в тройной комплекс соответствующих $(pU)_n$.

1. Стимулирование олигоуридилатами [^{32}P] pppU(pU) $_{n-1}$ связывания [^{14}C]Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$ с 70S рибосомой в присутствии и в отсутствие матрицы

Poly(U)	pppU(pU) $_{n-1}$			Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$	тРНК $^{\text{Phe}}$	Связывание, моль на 1 моль 70S рибосом	
	n=4	n=7	n=9			Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$	pppU(pU) $_{n-1}$
+	-	-	-	+	-	0,52 *	
-	+	-	-	+	-	0,26	
-	-	+	-	+	-	0,45	
-	-	-	+	+	-	0,60	
-	+	-	-	-	+		0,29 **
-	-	+	-	-	+		0,49
-	-	-	+	-	+		0,65

* Связывание Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$ в отсутствие матрицы составляет 0,08 моль на 1 моль 70S рибосом.

** Связывание pppU(pU) $_{n-1}$ в отсутствие тРНК $^{\text{Phe}}$ составляет 0,05 моль на 1 моль 70S рибосом.

На одном из полученных реагентов — [^{32}P]pppU(pU) $_6$ — была продемонстрирована возможность применения трифосфатов олигорибонуклеотидов для аффинной модификации рибосом в районе мРНК-связывающего центра. Модификацию рибосом осуществляли в составе специфического тройного комплекса рибосома · [^{32}P]pppU(pU) $_6$ · тРНК $^{\text{Phe}}$. Тройной комплекс отделяли от избытка несвязавшегося pppU(pU) $_6$ гель-фильтрацией и обрабатывали 5 мМ СМЕС при 20° С для активации трифосфатной группы. Поскольку при действии СМЕС на олигорибонуклеотид, не замещенный по 2'-оксигруппам [11], можно было ожидать образования циклических фосфотриэфиров и последующей изомеризации фосфодиэфирных связей, проводили контрольный эксперимент, в котором трифосфат олигоуридилата обрабатывали СМЕС в тех же условиях, что и тройной комплекс. Последующий анализ гидролизата, полученного обработкой pppU(pU) $_6$ смесью фосфомоноэстеразы и РНКазы А, показал, что в этих условиях изомерные фосфодиэфирные связи не образуются. Степень фосфорилирования 70S рибосом определяли методом фильтрования реакционной смеси через нитроцеллюлозные фильтры, предварительно разрушая тройной комплекс обработкой 0,1 М NH $_4$ Cl в присутствии 0,02 М EDTA. Реакция фосфорилирования заканчивается уже через 5 мин. Степень фосфорилирования составляет 0,1 моль остатков pppU(pU) $_6$ на 1 моль 70S рибосом.

Согласно работе [13], СМЕС обладает денатурирующим действием на тРНК, что может вызывать дестабилизацию тройного комплекса. В контрольном эксперименте было установлено, что степени связывания [^{14}C]Phe-тРНК $^{\text{Phe}}$ в комплексе с рибосомами и (pU) $_7$ до и после обработки тройного комплекса 5 мМ СМЕС совпадают. Возможные сдвиги рибосомных компонентов или деградация рибосом под действием 5 мМ СМЕС в течение 10 мин не наблюдались. Анализ рибосом до и после обработки тройного комплекса 5 мМ СМЕС методом ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы в условиях диссоциации рибосом на субчастицы показал полное совпадение профилей седиментации 30S и 50S рибосомных субчастиц. По окончании реакции фосфорилирования рибосом тройной комплекс разрушали центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в условиях диссоциации и разделения 70S рибосом на субчастицы. Данные по распределению радиоактивной метки между рибосомными субчастицами (табл. 2) свидетельствуют о том, что фосфорилированию pppU(pU) $_6$ под действием СМЕС подвергаются обе субчастицы. Степень модификации составляет 0,07 и 0,03 моль pppU(pU) $_6$ на 1 моль 30S и 50S субчастиц соответственно. В отдельных экспериментах тройной комплекс рибосома · pppU(pU) $_6$ · тРНК $^{\text{Phe}}$ обрабатывали 5 мМ СМЕС без предварительного отделения от избытка несвязавшегося pppU(pU) $_6$. Степень фосфорилирования рибосомных субчастиц приведена в табл. 2. В контрольном опыте в отсутствие тРНК $^{\text{Phe}}$ заметного фосфори-

Степень модификации рибосомных субчастиц $\text{pppU}(\text{pU})_6$ при действии СМЕС

Добавляемые компоненты		Степень модификации рибосомных субчастиц, моль остатков $\text{pppU}(\text{pU})_6$ на 1 моль субчастиц	
тРНК ^{Phe}	(pU), *	30S	50S
+	-	0,070 **	0,030 **
+	-	0,075	0,040
-	-	0,015 ***	
+	+	0,010	0,015

* Фосфорилирующим агентом в данном опыте являлся предварительно полученный триметафосфат гептауридилата.

** До обработки СМЕС тройной комплекс выделяли гель-фильтрацией.

*** Степень модификации 70S рибосом.

лирования рибосом $\text{pppU}(\text{pU})_6$ под действием СМЕС не наблюдалось при концентрациях рибосом, $\text{pppU}(\text{pU})_6$ и СМЕС, используемых для аффинной модификации (2–5 мкМ рибосом, 30 мкМ $\text{pppU}(\text{pU})_6$, 5 мМ СМЕС).

В пользу специфичности фосфорилирования рибосом вблизи мРНК-связывающего центра трифосфатом [^{32}P] $\text{pppU}(\text{pU})_6$ свидетельствует ингибирующий эффект гептауридилата на реакцию фосфорилирования. При добавлении циклического триметафосфата гептауридилата, полученного по методу [6], после преинкубации рибосом с тРНК^{Phe} и 50-кратным мольным избытком гептауридилата по отношению к фосфорилирующему реагенту (см. «Экспериментальную часть») наблюдается отчетливое ингибирование гептауридилатом фосфорилирования как 30S, так и 50S субчастиц (табл. 2). Однако фосфорилирование 30S субчастиц подавлялось (pU)₇ в большей степени, чем фосфорилирование 50S субчастиц.

Из 30S и 50S субчастиц, модифицированных производным [^{32}P] $\text{pppU}(\text{pU})_6$, выделяли рРНК и белки [1]. Как в 30S, так и в 50S субчастицах основная доля модификации (до 90%) приходилась на рибосомные белки. В отдельных экспериментах рибосомные белки выделяли из модифицированных 70S рибосом. Белки, содержащие ковалентно связанный олигонуклеотид, отделяли от немодифицированных белков ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой. При таком методе выделения кислые немодифицированные белки попадали во фракцию модифицированных белков и поэтому не были идентифицированы. Ковалентную связь между белками и олигонуклеотидными фрагментами разрушали мягким кислотным гидролизом [14]. В результате ^{32}P -метка полностью отщеплялась от модифицированных белков, поэтому для последующей идентификации в модифицированные белки вводили новую ^3H -метку с помощью восстановительного метилирования по методу [15].

Модифицированные белки, меченные ^3H , анализировали двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле. На рис. 4 приведена диаграмма

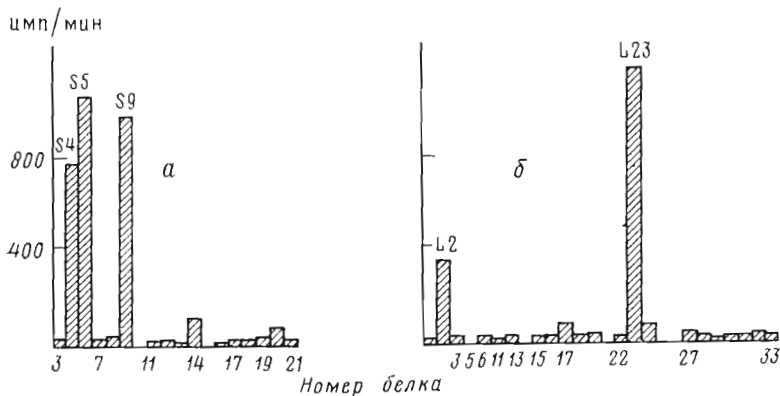


Рис. 4. Диаграмма распределения метки ^3H между белками 30S (а) и 50S (б) рибосомных субчастиц

распределения ^3H -радиоактивности между рибосомными белками, модифицированными $\text{pppU}(\text{pU})_6$ под действием СМЕС.

При действии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимиды на свободные 30S субчастицы *E. coli* [16] и свободные 40S и 60S субчастицы из печени крысы [17] наблюдались ковалентные шивки между рРНК и белками. В настоящей работе при выбранной методике выделения белков, модифицированных с помощью $\text{pppU}(\text{pU})_6$, можно было ожидать попадания во фракцию модифицированных белков ковалентных комплексов рРНК-белок, которые могут образовываться при действии СМЕС на 70S рибосомы, и ошибочного тестирования такого рода белков как модифицируемых производным $\text{pppU}(\text{pU})_6$. Поэтому в контрольном эксперименте свободные 70S рибосомы подвергали действию СМЕС в условиях, аналогичных аффинной модификации, и выделяли из них рибосомные белки по методике, использованной для выделения модифицированных белков (см. выше). Последующий анализ с помощью двумерного гель-электрофореза не выявил ни одного рибосомного белка, содержащего метку ^3H .

Следовательно, если шивки между рРНК и белками и происходят под действием СМЕС, то в условиях обработки модифицированных рибосом 2 М LiCl в 4 М мочевины белки с ковалентно связанной рРНК (или ее фрагментами) скорее всего осаждаются вместе с рибосомными РНК, практически не попадая в белковый супернатант, который затем подвергается хроматографии на DEAE-целлюлозе и последующему восстановительному метилированию.

Доказательством специфичности модификации рибосомных белков S4, S5, S9 и L2 в районе мРНК-связывающего центра является практически полное ингибирование фосфорилирования этих белков избытком гептауридилата. Так, среди белков 70S рибосом, обработанных предварительно образованным циклическим триметафосфатом гептауридилата в присутствии тРНК^{Phe} и избытка (pU)₇, после хроматографии на DEAE-целлюлозе и последующего восстановительного метилирования не было обнаружено радиоактивных белков S4, S5, S9, L2 при анализе белкового супернатанта двумерным гель-электрофорезом. Модификация белка L23 была отнесена к неспецифической, поскольку практически не подавлялась в условиях ингибирования фосфорилирования. На основании такого анализа белки S4, S5, S9, L2 отнесены к 5'-области мРНК-связывающего центра.

Ранее для исследования 5'-области мРНК-связывающего центра были использованы аналоги мРНК — 4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензил-N-(2,4-динитро-5-азидофенил)-2-аминоэтил-5'-фосфамиды олигоурцидилатов — с близкой друг другу по размерам активной группы (10 и 8 Å соответственно) [2, 18]. Аффинной модификации в составе тройного комплекса рибосома · реагент · тРНК^{Phe} подвергались обе субчастицы, причем степень модификации 50S субчастицы возрастала с увеличением длины цепи олигонуклеотидного фрагмента и в случае производных гептауридилата приближалась к степени модификации 30S субчастицы. Уменьшение размера активной группы до ~3 Å в случае $\text{pppU}(\text{pU})_6$ позволило значительно снизить относительную степень модификации 50S субчастиц (до 30% от суммарной степени модификации).

В свете последних данных [19] можно предположить, что при связывании коротких олигонуклеотидов с рибосомами и деацилированной тРНК последняя заполняет в основном Р-сайт рибосомы. В таком случае вследствие неоднозначности посадки гомогенной матрицы на рибосоме в составе тройного комплекса длина спейсерного участка в $\text{pppU}(\text{pU})_6$, не зафиксированного на рибосоме кодон-антиконовым взаимодействием, может увеличиваться от 3 до 19 Å для разных типов посадки (размер одного нуклеотидного остатка 4 Å, если в олигоурцидилатном фрагменте, не вовлеченном в кодон-антиконовое взаимодействие, сохраняется А-форма спирали). Таким образом, аффинной модификации $\text{pppU}(\text{pU})_6$ под действием СМЕС могут подвергаться как белки, непосредственно формирующие мРНК-связывающий центр, так и белки, находящиеся на расстоянии ~19 Å от участка декодирования. Из четырех выявленных нами белков,

подвергающихся фосфорилированию рррU(pU)₆, белки S4 и S5 с наибольшей вероятностью могут быть отнесены к зоне декодирования: 1) среди белков, подвергающихся аффинной модификации аналогами мРНК, наряду с белком S3 наиболее часто встречаются белки S4 и S5 [1, 2, 18, 20, 21]; 2) белки S4 и S5 образуют вместе с белком S12 своеобразный структурный и функциональный домен в 30S субчастице [22]; 3) белки S4 и S5 сшиваются бифункциональным реагентом длиной ~20 Å [23, 24]; 4) расстояние между центрами масс S4 и S5, измеренное методом нейтронного рассеяния, равно 39,7 Å [25] (т. е. эти белки расположены рядом). Что касается белка S9, то он находится совсем в другой области 30S субчастицы (в верхней части «головки») [26]. Можно предположить, что модификация белков S9 и, возможно, L2 вызвана тем, что химически активная группа не зафиксирована жестко относительно рибосомы вблизи участка декодирования из-за отсутствия кодон-антикодонного взаимодействия в А-сайте. Все белки, специфично фосфорилируемые в присутствии рррU(pU)₆, модифицируются алкилирующими производными олигоуридилатов, белки S4, S9, L2 — фотоактивируемыми производными олигоуридилатов с модифицирующими группами на 5'-конце [2, 18]. Кроме того, белок S9 модифицировался производными олигоуридилатов (от пента- до окта-) с алкилирующей группой на 3'-конце [1].

Экспериментальная часть

В работе использовали: рибосомы и тРНК *E. coli* MRE-600 (Олайне); тетра-, гепта-, нонауридилаты, содержащие фосфат на 5'-конце (любезно предоставлены А. Г. Веняминой — Новосибирский государственный университет); [³²P]Na₂H₂P₂O₇ отечественного производства с удельной радиоактивностью 25 Ки/моль; [¹⁴C]фенилаланин с удельной радиоактивностью 400 Ки/моль (UVVVR, СССР); фенилаланил-тРНК-синтетазу (КФ 6.1.1.20; любезно предоставлена В. Н. Анкиловой, Новосибирский институт биоорганической химии); тРНК^{phe} *E. coli* (получена Д. М. Грайфером, Новосибирский государственный университет); полиуридиловую кислоту и щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1, производство НИКТИ БАВ); РНКазу А (КФ 3.1.4.22, Sankyo Co, Япония); [³H]боргидрид натрия с удельной радиоактивностью 2,9 Ки/моль (отечественного производства); молселект Г-10 (Reanal, Венгрия); биогель Р-2 (Bio-Rad, США). Аминоацилирование тРНК [¹⁴C]фенилаланином и определение степени аминоацилирования проводили по методу [27]. Микроколоночную хроматографию осуществляли на капиллярных колонках объемом 60 мкл с DEAE-целлюлозой DE-52 Whatman (Англия) или объемом 190 мкл с Nucleosil RPC 18 Macherey-Nagel and Co (ФРГ). УФ-поглощение регистрировали с помощью приставки МСФП-III, изготовленной в Новосибирском институте органической химии, или ультрамикроспектрофотометра «Милхром» (отечественного производства).

Трифосфаты олигоуридилатов. К 0,35 ммоль олигоуридилата, растворенного в 0,9 мл воды, добавляли 0,1 мл DMF и при интенсивном перемешивании при 5–7° С 1 мл свежеперегнанного уксусного ангидрида. В реакционной смеси поддерживали рН 5,5–6,0 титрованием 5 н. NaOH. Ацетилированный олигоуридилат обессоливали гель-фильтрацией на колонке с биогелем Р-2 или молселектом Г-10 (1,8×50 см). Водный раствор упаривали до 1 мл. Степень ацетилирования определяли по гидроксамовой реакции, как в работе [10]. Пиридиневую соль ацетилированного олигоуридилата получали, используя колонку с дауэксом 50×2 (1,1×21 см) в пиридиневой форме. Элюат упаривали досуха и высушивали упариванием с абс. пиридином (3×0,5 мл), затем с сухим бензолом (3×0,5 мл). Сухой остаток растворяли в 60 мкл абс. DMF, приливали 6 мкл 0,5 М раствора DCC в абс. DMF и выдерживали 3 ч при 20° С. Затем реакционную смесь приливали к 0,06 ммоль бис(три-*n*-бутиламмоний)-[³²P]пирофосфата, полученного из [³²P]пирофосфата натрия переводом в пиридиневую соль на колонке с дауэксом 50×2 (1,1×21 см), а затем в трибутиламмониевую — упариванием пиридиневой соли с 2-крат-

ным молярным избытком три-*n*-бутиламина [5]. Реакционную смесь выдерживали 1 сут при 20°С, осаждали в 20 мл абс. эфира и дважды пересаждали из DMF в эфир. Осадок высушивали в вакууме над CaCl₂. К полученному осадку приливали 1 мл 25% водного аммиака и выдерживали 2 ч при 50°С. Нерастворившуюся N,N'-дициклогексилмочевину отделяли затем центрифугированием. Супернатант упаривали досуха и, добавляя воду к сухому остатку, упаривали до отсутствия запаха аммиака. Продукт растворяли в воде, измеряли поглощение при 260 нм и анализировали микроколоночной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 объемом 60 мкл в градиенте концентрации KН₂РO₄ в 6 М мочеvine при рН 7,7 (рис. 1) или с Nucleosil RPC 18 (190 мкл) в градиенте концентрации метилового спирта (0–20%) в 0,03 М СН₃СООН₄ (рН 4,85) в 7 М мочеvine, контролируя УФ-поглощение на приборе «Милхром». Трифосфат олигоуридилата составлял 30% от всего УФ-поглощающего материала. Кроме того, наблюдали образование ди- и полифосфатов. Трифосфат олигоуридилата выделяли в условиях аналитического опыта, нанося на колонку с Nucleosil RPC 18 (190 мкл) по 5–15 ОЕ₂₆₀ продуктов в 50–200 мкл воды. Нужную фракцию обессоливали и лиофилизировали. Наличие трифосфатной группы подтверждали с помощью частичного фосфомоноэстеразного гидролиза [5] (рис. 2).

Изомеризацию межнуклеотидных связей в rrrU(pU)_{n-1} контролировали после полного фосфомоноэстеразного гидролиза и последующего гидролиза дефосфорилированного продукта пиримидил-РНКазой как описано в работе [11] (рис. 3).

Получение тройного комплекса рибосома · [³²P]rrrU(pU)_{n-1} (n=4, 7, 9) · тРНК^{Р^he}. К 0,22 нмоль активированных при 37°С в течение 15 мин рибосом в 25 мкл буфера А (50 мМ какодилат натрия (рН 5,5), 50 мМ NH₄Cl, 10 мМ MgCl₂) добавляли 1 нмоль [³²P]rrrU(pU)_{n-1} в 12 мкл того же буфера и 1 нмоль тРНК^{Р^he} (активированной при 37°С, 15 мин) в 3 мкл буфера А. Реакционную смесь инкубировали 40 мин при 0°С. Тройной комплекс отделяли от несвязавшегося [³²P]rrrU(pU)_{n-1} гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (0,4×28 см), уравновешенным буфером А. Фракции, соответствующие рибосомам, объединяли, измеряли УФ-поглощение при 260 нм и просчитывали радиоактивность по Черенкову.

Фосфорилирование рибосом в составе специфического тройного комплекса рибосома · rrrU(pU)_{n-1} (n=7) · тРНК^{Р^he} при действии СМЕС. К тройному комплексу, полученному как описано выше, добавляли раствор СМЕС в буфере А до конечной концентрации 5 мМ и выдерживали 10 мин при 20°С. Рибосомы осаждали 0,7 объема этанола.

Фосфорилирование рибосом rrrU(pU)₆ под действием СМЕС в отсутствие тРНК. 1,1 нмоль рибосом в 150 мкл буфера А активировали 15 мин при 37°С, добавляли 5,5 нмоль [³²P]rrrU(pU)₆ в 150 мкл того же буфера и выдерживали 40 мин при 0°С. Затем к реакционной смеси добавляли раствор СМЕС в буфере А до конечной концентрации 5 мМ и инкубировали 10 мин при 20°С. Рибосомы отделяли от реагента гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 (25×0,5 см), фракцию рибосом собирали, измеряли УФ-поглощение при 260 нм и просчитывали радиоактивность по Черенкову. В параллельном опыте с рибосомами проводили аналогичные процедуры без добавления СМЕС.

Разделение модифицированных рибосом на субчастицы проводили центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в буфере, содержащем 0,05 М трис-НСl (рН 7,2), 0,1 М NH₄Cl, 5·10⁻⁴ М MgCl₂. На 30 мл градиента наносили 1,8 нмоль модифицированных рибосом в 1 мл указанного выше буфера и центрифугировали 19 ч при 4°С на ультрацентрифуге К-32 в бакет-роторе при 27 000 об/мин. Затем содержимое пробирок фракционировали, контролируя УФ-поглощение при 260 нм на приставке МСФП-III. Во фракциях, соответствующих 30S и 50S субчастицам, просчитывали радиоактивность по Черенкову.

Конкурентное ингибирование гептауридилатом фосфорилирования рибосом предобразованным [³²P]триметафосфатом гептауридилата в тройном комплексе. К 4,8 нмоль рибосом, активированных 15 мин при 37°С в 1,1 мл

буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ NH₄Cl и 10 мМ MgCl₂, добавляли 12 нмоль тРНК^{рнс} и 730 нмоль (рU)₇ и инкубировали 40 мин при 0° С, затем добавляли 14,6 нмоль [³²P]триметафосфата гептауридилата [6] в 0,9 мл буфера (0,05 М 2-морфолиноэтансульфокислота, рН 5,5) и выдерживали 10 мин при 20° С. Распределение метки ³²P по субчастицам анализировали центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы как описано выше.

Разделение рРНК и рибосомных белков осуществляли по методу [1]. К 0,88 нмоль модифицированных рибосом в 300 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ NH₄Cl, 10 мМ MgCl₂ и 6 мМ β-меркаптоэтанол, приливали равный объем раствора 4 М LiCl в 8 М мочеvine, смесь выдерживали 1 сут при 0° С. Осадок рРНК отделяли центрифугированием в течение 20 мин (5000 об/мин, 0° С), промывали его 2×50 мкл раствора 2 М LiCl в 4 М мочеvine. Супернатанты объединяли и диализовали против буфера 0,01 М трис-НСl (рН 7,5) в 7 М мочеvine на холоде.

Выделение модифицированных белков, содержащих ковалентно присоединенный олигоуридилат, проводили как описано в работе [1]. На колонку (0,6×5 см) с DEAE-целлюлозой DE-52, уравновешенной буфером 0,01 М трис-НСl (рН 7,5) в 7 М мочеvine, нанесли 1 мл раствора смеси модифицированных и немодифицированных рибосомных белков в том же буфере. Колонку промывали буфером 0,01 М трис-НСl (рН 7,5) в 7 М мочеvine (элюция немодифицированных белков) и затем 0,5 М NaCl в указанном буфере (элюция модифицированных белков). К последней фракции добавляли СН₃COOH до рН 2,5 и инкубировали 30 мин при 37° С [14]. Раствор нейтрализовали щелочью, диализовали против 0,05 М Na₂B₄O₇ (рН 9,2) в 7 М мочеvine и концентрировали против 30% раствора полиэтиленгликоля (M 35 000) в том же буфере до объема 300–600 мкл.

Восстановительное метилирование рибосомных белков проводили в условиях, описанных в работе [15].

Разделение рибосомных белков двумерным гелем электрофорезом в полиакриламидном геле осуществляли согласно [1]. В качестве носителя использовали 70S рибосомные белки в количестве 2–3 мг, добавленные к 50 мкл раствора [³H]белков, полученных как описано выше. Белки элюировали из геля 0,5% раствором додецилсульфата натрия в течение 2 сут при 60° С. Радиоактивность проб определяли в диоксановом сцинтилляторе.

Авторы благодарят Г. И. Барама за помощь, оказанную при выделении трифосфатов олигоуридилатов микроколониной хроматографией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gimauldinova O. I., Karpova G. G., Knorre D. G., Kobetz N. D. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 14, p. 3465–3481.
2. Гимауддинова О. И., Карпова Г. Г., Козырева Н. А. Молекулярн. биология, 1982, т. 16, вып. 4, с. 752–761.
3. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1969, вып. 1, с. 104–109.
4. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чимитова Т. А. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 210–214.
5. Бужер В. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Кобец Н. Д., Рязанкина О. И. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 5, с. 618–624.
6. Бабкина Г. Т., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кнорре Д. Г., Ковригина В. С. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1975, вып. 3, с. 128–132.
7. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 5, с. 611–615.
8. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Кнорре В. Л., Негесов С. В. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 12, с. 1612–1618.
9. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Курбагов В. А., Негесов С. В. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. наук, 1976, вып. 1, с. 117–123.
10. Кнорре Д. Г., Малышева А. Н., Пустошилова Н. М., Севастьянов А. В., Шамовский Г. Г. Биохимия, 1966, т. 31, вып. 6, с. 1181–1186.
11. Гимауддинова О. И., Гринева Н. И., Денисова Л. Я., Ломакина Т. С., Пустошилова Н. М. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 12, с. 1633–1640.
12. Друца В. Л., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Докл. АН СССР, 1977, т. 233, № 5, с. 595–597.

13. Беккер Ж. М., Молин Ю. Н., Гиршович А. С., Грачев М. А., Кнорре Д. Г. Молекулярн. биология, 1969, т. 3, вып. 3, с. 367-372.
14. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбагов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В. Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 6, с. 793-798.
15. Moans L. E., Feeney R. E. Biochemistry, 1968, v. 7, № 6, p. 2192-2196.
16. Chiarrutini C., Expert-Bezançon A. FEBS Lett., 1980, v. 119, № 1, p. 145-149.
17. Buisson M., Reboud A. M. FEBS Lett., 1982, v. 148, № 2, p. 247-250.
18. Гимаутдинова О. И., Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Подуст Л. М. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, вып. 4, с. 907-917.
19. Кириллов С. В. В кн.: Итоги науки и техники. Биол. химия, 1983, т. 18, с. 5-98.
20. Towbin H., Elson D. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 4, p. 3389-3407.
21. Pongs O., Rossner E. Nucl. Acids Res., 1975, v. 3, № 9, p. 1625-1633.
22. Winkelmann D. A., Kahan L. Q. J. Mol. Biol., 1983, v. 165, № 2, p. 357-374.
23. Expert-Bezançon A., Barritault D., Milet M., Guerin M. F., Hayes D. J. Mol. Biol., 1977, v. 112, № 5, p. 603-629.
24. Peretz H., Towbin H., Elson D. Eur. J. Biochem., 1976, v. 63, № 1, p. 83-92.
25. Ramakrishnan V. R., Yabuki S., Sillers I. Y., Schinder D. C., Engelman D. M., Moore P. B. J. Mol. Biol., 1981, v. 153, № 3, p. 739-760.
26. Spirin A. S., Serdyuk I. N., Shpungin T. L., Vasiliev V. D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 10, p. 4867-4871.
27. Кнорре Д. Г., Сиротюк В. И., Стефанович Л. Е. Молекулярн. биология, 1967, т. 1, № 6, с. 837-843.

Поступила в редакцию
1.VIII.1984
После доработки
3.X.1984

**AFFINITY LABELLING OF *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES
WITH A DERIVATIVE OF HEPTAURIDYLIC ACID 5'-TRIPHOSPHATE
AS A mRNA ANALOGUE**

GJMAUTDINOVA O. I., KARPOVA G. G., KOMAROVA N. I.,
FROLOVA S. B.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of the
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk, USSR*

Oligouridylylates 5'-[β,γ - ^{32}P]triphosphates have been synthesized. Affinity labelling of the mRNA-binding centre of *E. coli* ribosomes has been studied by means of [^{32}P]pppU(pU)₆ and N-cyclohexyl-N'- β -(4-methylmorpholinium)ethyl carbodiimide, the phosphorylation coming to an end after 5 min. About 20% of pppU(pU)₆ bound in the ternary complex linked covalently to the ribosomes. Both 30S and 50S subunits were labelled, the extent of 30S subunit modification being twice higher than 50S. Ribosomal proteins specifically labelled with the derivative of pppU(pU)₆ were identified as S4, S5, S9, and L2. No phosphorylation of ribosomal RNAs was observed.