



УДК 577.217.34

ПРИМЕНЕНИЕ СШИВАЮЩИХ ПЛАТИНОВЫХ РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ тРНК  
И мРНК С РИБОСОМАМИ

Владимиров С. Н., Грайфер Д. М., Зенкова М. А.,  
Казаков С. А., Картова Г. Г., Кононова Р. Г.

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР

На примере различного типа комплексов [70S рибосома (*E. coli*)-тРНК-матрица] впервые продемонстрирована возможность применения бифункциональных реагентов платины(II) для исследования структурной организации тРНК- и мРНК-связывающих центров рибосомы. Показано, что при обработке комплексов [70S рибосома-As[<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>.poly(U)], [70S рибосома-3'-<sup>32</sup>рСр-тРНК<sup>Phe</sup>.poly(U)], [70S рибосома-f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>.AUGU<sub>6</sub>] платиновыми реагентами происходит ковалентное присоединение тРНК к рибосомам. AsPhe-тРНК<sup>Phe</sup> и 3'-рСр-тРНК<sup>Phe</sup> в Р-участке рибосом «сшиваются» преимущественно с 30S субчастицей. В составе комплекса инициации fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> «сшивается» примерно в одинаковой степени с обеими рибосомными субчастицами. Степень ковалентного присоединения fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> к рибосомам примерно в 2 раза превышает степень присоединения AsPhe-тРНК<sup>Phe</sup> и 3'-рСр-тРНК<sup>Phe</sup>. Все виды тРНК ковалентно присоединяются в сравнимой степени к рРНК и белкам обеих рибосомных субчастиц. В комплексе [70S рибосома-fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>.<sup>32</sup>рAUGU<sub>6</sub>] наблюдается ковалентное присоединение <sup>32</sup>рAUGU<sub>6</sub> исключительно к 30S субчастице, причем только к 16S РНК. В отсутствие fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> степень присоединения <sup>32</sup>рAUGU<sub>6</sub> к 16S РНК уменьшается в 4 раза.

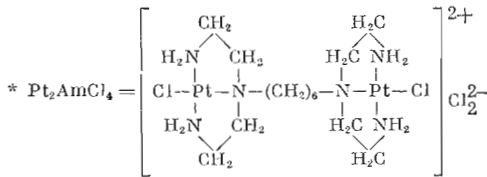
Для изучения функциональной топографии рибосом все большее применение находят бифункциональные химические реагенты, способные образовывать «сшивки» между нуклеиновыми кислотами и белками [1, 2]. Однако выбор подходящих сшивающих реагентов пока весьма ограничен. К тому же часть из них плохо растворима в воде и требует поэтому присутствия в реакционной среде органических растворителей, искажающих нативную структуру рибосом (для обзора см. [1]). Строгая специфичность химически активных группировок используемых реагентов к определенным функциональным группам белков и нуклеиновых кислот ограничивает число возможных «сшивок» [1].

К числу наиболее перспективных «сшивающих» реагентов принадлежат соединения платины. Ранее было показано, что бифункциональные платиновые реагенты образуют «сшивки» между биополимерами, входящими в состав таких нуклеопротеидов, как хроматин [2], вирусы [3] и комплексы тРНК-аминоацил-тРНК-синтетаза [4]. Платиновые реагенты способны модифицировать в них целый ряд функциональных групп, реакционная способность которых в реакции модификации убывает следующим образом: N7 (G) > N1 (A) > N3 (C) > N3 (T, U) в нуклеиновых кислотах и -SCH<sub>3</sub>(Met) > -SH(Cys) > N(His) > -NH<sub>2</sub>(Lys) — в белках [2-4]. Продукты платинирования устойчивы в условиях выделения и анализа «сшивок». Вместе с тем образованные платиновыми соединениями «сшивки» могут быть расщеплены в мягких условиях при действии тиомочевины [4] или KCN [5]. При этом происходит полная демодификация «сшитых» фрагментов белков и нуклеиновых кислот, которые легко могут быть идентифицированы по их положению на пептидных или олигонуклеотидных картах.

Сокращения: fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> — инициаторная тРНК, ацилированная формилметионином, As-Phe-тРНК<sup>Phe</sup> — фенилаланиновая тРНК, ацилированная N-ацетилфенилаланином, 3'-<sup>32</sup>рСр-тРНК<sup>Phe</sup> — фенилаланиновая тРНК, меченная по 3'-концу <sup>32</sup>рСр с помощью T4-РНК-лигазы (КФ 6.5.1.3), SDS — додецилсульфат натрия.

Степень ковалентного присоединения [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> к рибосомам в составе комплекса [70S рибосома·poly(U)·тРНК] при его обработке различными соединениями платины(II) % от количества [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, связанной в комплекс

Реагент	Концентрация реагента, мМ	Степень присоединения [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК <sup>Phe</sup> , %
<i>транс</i> -Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,06	3
<i>транс</i> -Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,40	5
<i>цис</i> -Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0,40	4
K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub>	0,10	2
Pt <sub>2</sub> AmCl <sub>4</sub> *	0,06	4
Pt <sub>2</sub> AmCl <sub>4</sub>	0,40	16



В настоящей работе мы впервые использовали соединения платины(II) для изучения взаимодействия тРНК и мРНК с рибосомой.

Для сравнения эффективности присоединения [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> к Р-участку рибосом в присутствии poly(U) различными соединениями платины(II) тройные комплексы [[ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>·рибосома poly(U)] инкубировали при 20° С с реагентами, взятыми в различных концентрациях. Рибосомы брали в избытке по отношению к [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, чтобы связывание происходило только в Р-участке [6]. Степень poly(U)-зависимого связывания [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с рибосомами определяли методом фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры при pH 7,5. В условиях инкубации с платиновыми реагентами (но в отсутствие последних) степень связывания составляла 0,4 моль [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> на 1 моль 70S рибосом. В случае обработки платиновыми реагентами тройные комплексы разрушали добавлением EDTA для снижения концентрации ионов Mg<sup>2+</sup> до 1 мМ, после чего рибосомы, содержащие ковалентно пришитую тРНК, отделяли от свободной тРНК методом гель-фильтрации. Контрольный эксперимент в отсутствие платиновых реагентов показал, что фракция рибосом после гель-фильтрации не содержит тРНК. Таким образом, по содержанию радиоактивной метки во фракции рибосом можно судить о степени ковалентной пришивки тРНК при обработке комплексов различными соединениями платины(II). Как видно из табл. 1, наиболее эффективным «сшивающим» реагентом при высоких концентрациях в реакционной смеси является соединение Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub>, в котором расстояние между реакционноспособными группировками составляет ~15 Å [7].

Этот реагент был использован нами для изучения ковалентного связывания тРНК к Р-участку рибосом *E. coli* в составе следующих комплексов: [Ac[ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>·poly(U)·рибосома] (комплекс 1), [3'-<sup>32</sup>P-рСр-тРНК<sup>Phe</sup>·poly(U)·рибосома] (комплекс 2) и [f[ $^{35}\text{S}$ ]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>·AUGU<sub>6</sub>·рибосома] (комплекс 3). Для изучения ковалентного связывания аналога мРНК использовали <sup>32</sup>P-AUGU<sub>6</sub> и немеченую fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>; соответствующий комплекс обозначали как (3а).

Комплексы (1) и (2) получали инкубацией 70S рибосом с соответствующей тРНК и poly(U) при 0° С и концентрации ионов Mg<sup>2+</sup> 10 мМ. Комплексы (3) и (3а) получали инкубацией соответствующего предобразованного комплекса [30S субчастица·AUGU<sub>6</sub>·инициаторная тРНК], полученного в присутствии инициаторного фактора IF2 и GTP, с 50S

субчастицей при 37° С и концентрации ионов  $Mg^{2+}$  5 мМ. Перед обработкой «сшивающим» реагентом  $Pt_2AmCl_4$  все комплексы отделяли от несвязанных тРНК и матрицы гель-фильтрацией на сефадексе G-200 при рН 6,5 для снижения степени дезацилирования тРНК. При этом степени связывания меченой тРНК (или  $^{32}pAUGU_6$ ) с рибосомой были такими же, как и при определении методом фильтрования тройных комплексов через нитроцеллюлозные фильтры при рН 7,5 (табл. 2). Заметной диссоциации тройных комплексов не наблюдалось также и в условиях инкубации комплексов с реагентом (рН 6,5; 40 мин, 20° С, 0,4 мМ  $Pt_2AmCl_4$ ).

Степень ковалентного присоединения тРНК или матрицы к рибосомным субчастицам оценивали с помощью центрифугирования обработанных реагентом комплексов в градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в условиях диссоциации 70S рибосом на субчастицы (0,5 мМ  $Mg^{2+}$ ). Профиль седimentации субчастиц с ковалентно связанной тРНК (рис. 1) свидетельствует о том, что часть рибосом не диссоциирует в этих условиях, очевидно, из-за образования межсубчастичных «сшивок». По распределению радиоактивной метки между субчастицами можно судить о степени ковалентного связывания с ними тРНК или  $^{32}pAUGU_6$ . Анализ такого распределения показал, что тРНК в Р-участке сшивается преимущественно с 30S субчастицами (табл. 2), что хорошо согласуется с данными по фотоаффинной модификации рибосом реакционноспособными производными тРНК<sup>Phe</sup>, содержащими арилизидные группировки на атомах N7 гуаниновых остатков [8], а также с данными по прямым УФ-индуцированным «сшивкам» тРНК<sup>Phe</sup> с рибосомой [9].

Напротив, в составе комплекса инициации (3) fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> «сшивается» примерно в одинаковой степени с обеими рибосомными субчастицами, причем степень ковалентного присоединения fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> к рибосомам в комплексе (3) примерно в 2 раза выше, чем степень присоеди-

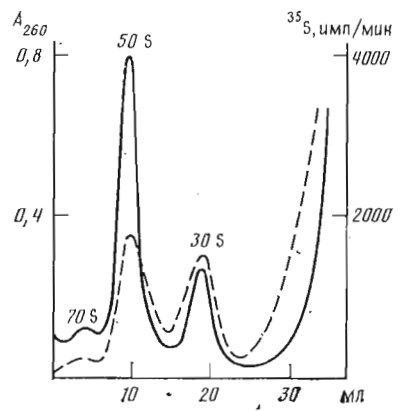


Рис. 1. Седimentация комплекса  $[70S \cdot AUGU_6 \cdot f[^{35}S]Met \cdot tRNA_f^{Met}]$ , обработанного  $Pt_2AmCl_4$ , в сахарозном градиенте (10–30%) в условиях диссоциации рибосом на субчастицы (0,5 мМ  $Mg^{2+}$ ). Сплошная линия —  $A_{260}$ , пунктирная — радиоактивность

Таблица 2

Ковалентное присоединение различных форм тРНК и  $pAUGU_6$  к рибосомным субчастицам при обработке соответствующих комплексов  $Pt_2AmCl_4$  и распределение «сшивок» между рРНК и белками в субчастицах

Комплекс	Степень связывания тРНК (или $pAUGU_6$ ), моль/моль, 70S рибосом	Степень ковалентной прививки, моль/моль субчастиц		Распределение прививки в субчастицах, %			
		30S	50S	30S		50S	
				16S РНК	белки	23S РНК	белки или 5S РНК
(1) 70S · Ac[ $^{14}C$ ]Phe-тРНК <sup>Phe</sup> · poly(U)	0,30	0,040	0,010	50	50	50	50
(2) 70S · 3'- $^{32}P$ -Cr-тРНК <sup>Phe</sup> · poly(U)	0,45	0,060	0,020	31	69	41	59
(3) 70S · f [ $^{35}S$ ] Met-тРНК <sub>f</sub> <sup>Met</sup> · AUGU <sub>6</sub>	0,25	0,050	0,040	48	52	42	58
(3a) 70S · fMet-тРНК <sub>f</sub> <sup>Met</sup> · $^{32}pAUGU_6$	0,40	0,006	0	100	0	0	0

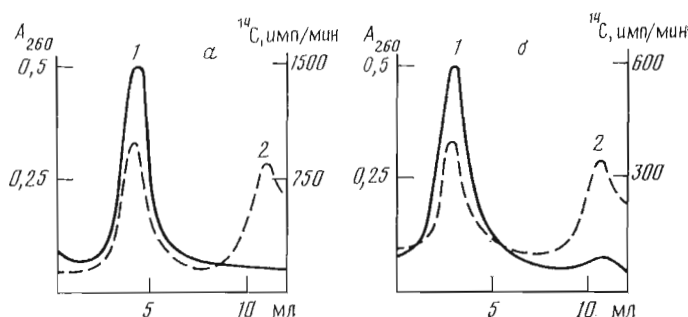


Рис. 2. Седиментация 30S (а) и 50S (б) рибосомных субчастиц с ковалентно связанной  $\text{Ac}^{14}\text{C}[\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}]$  в сахарозном градиенте (5–20%) в условиях диссоциации на рРНК и белки (0,1% SDS и 2 мМ EDTA). Сплошная линия —  $A_{260}$ , пунктирная — радиоактивность. Пик 1 — 16S РНК (а) и 23S РНК (б), пик 2 — белки (а) и 5S РНК и белки (б)

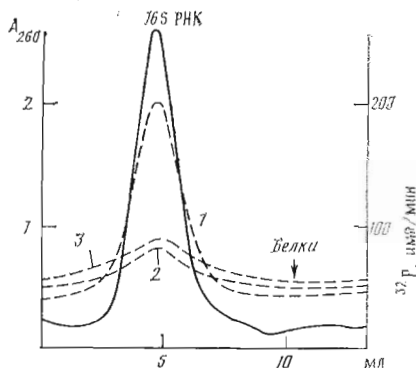
нения различных форм  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  в комплексах (1) и (2) (табл. 2). Различия в распределении «сшивок» между рибосомными субчастицами и в степенях ковалентного присоединения  $\text{tRNA}$  к субчастицам в комплексах (1), (2), с одной стороны, и в комплексе (3) — с другой, могут быть объяснены особенностями пространственной структуры  $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$  [10], а также различиями в первичных структурах  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  и  $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$  [11]. Подобные различия, а также различия в наборах модифицируемых белков ранее были обнаружены при исследовании взаимодействия с Р-участком 70S рибосом реакционноспособных производных  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  и  $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ , несущих арилазидогруппы, статистически распределенные по остаткам гуанозина [8, 12]. Кроме того, небольшие различия в наборах рибосомных белков, «сшивающихся» с  $f\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$  и  $\text{AcPhe-tRNA}^{\text{Phe}}$ , ранее были замечены с помощью УФ-индуцированных «сшивок» этих  $\text{tRNA}$  в соответствующих комплексах с 30S субчастицами [13, 14].

Олигонуклеотид  $^{32}\text{pAUGU}_6$  в комплексе (3а) «сшивается» исключительно с 30S субчастицей (табл. 2), на которой, как известно, находится декодирующий сайт. Следует отметить, что степень «сшивки»  $^{32}\text{pAUGU}_6$  с рибосомами в комплексе (3а) очень низка ( $\sim 2\%$ ) по сравнению со степенью «сшивки»  $f\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$  в комплексе (3) ( $\sim 40\%$ ) и производных  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  в комплексах (1) и (2) ( $\sim 20\%$ ). Поскольку за время инкубации с реагентом комплексы практически не диссоциировали, можно заключить, что все наблюдаемые «сшивки» происходили в составе специфичных комплексов.

О распределении ковалентно связанной  $\text{tRNA}$  или матрицы между рРНК и белками можно судить по результатам распределения соответствующей радиоактивной метки при центрифугировании тройных комплексов в градиенте концентрации сахарозы в присутствии SDS (рис. 2 и 3). Соответствующие данные для всех комплексов суммированы в табл. 2. Видно, что все виды  $\text{tRNA}$  «пришиваются» в сравнимой степени к рРНК и белкам обеих рибосомных субчастиц (табл. 2, рис. 2), а  $\text{pAUGU}_6$  — только к 16S РНК (табл. 2, рис. 3). Дополнительным свидетельством в пользу специфичности пришивки матрицы к 16S РНК в комплексе (3а) является то, что в отсутствие  $f\text{Met-tRNA}_f^{\text{Met}}$  степень ковалентного присоединения  $^{32}\text{pAUGU}_6$  к рРНК уменьшалась примерно в 4 раза. Кроме того, «сшивка»  $\text{pAUGU}_6$  с 16S РНК значительно ингибировалась в присутствии 10-кратного избытка дефосфорилированного  $\text{AUGU}_6$  (рис. 3). Преимущественная модификация 16S РНК в комплексе инициации наблюдалась ранее при использовании в качестве матрицы производного  $\text{AUGU}_6$  с алкилирующей группой на 3'-конце [15].

Таким образом, на примере различного типа комплексов в настоящей работе впервые продемонстрирована возможность применения бифункциональных производных платины(II) для исследования структурной организации  $\text{tRNA}$ - и  $\text{mRNA}$ -связывающих центров рибосомы.

Рис. 3. Седиментация 30S субчастиц с ковалентно связанным  $^{32}\text{P}$ AUGU<sub>6</sub> в сахарозном градиенте (5–20%) в условиях диссоциации на 16S рНК и белки. Сплошная линия —  $A_{260}$ , пунктирные — распределение  $^{32}\text{P}$ -радиоактивности при образовании комплекса в присутствии fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> (1), в отсутствие тРНК (2), в присутствии fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> и 10-кратного избытка немеченого AUGU<sub>6</sub> по отношению к  $^{32}\text{P}$ AUGU<sub>6</sub> (3)



## Экспериментальная часть

В работе использовали тРНК<sup>Phe</sup> и тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> (Boehringer Mannheim, ФРГ), [ $^{14}\text{C}$ ]Phe с удельной радиоактивностью 40 Ки/моль (UVVVR, ЧССР), poly(U) и СТР (Reanal, ВНР),  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]АТР и  $^{32}\text{P}$ Ср с удельной радиоактивностью >1000 Ки/моль (отечественного производства), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78) и Т4-РНК-лигазу (КФ 6.5.1.3) отечественного производства, нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,40 мкм (Сметарол, ЧССР). Фенилаланил-тРНК-синтетеза (КФ 6.1.1.20) предоставлена В. Н. Анкиловой (НИБХ), AUGU<sub>6</sub> [16] — А. Г. Веньяминовой (НИБХ), рибосомы *E. coli* (активности в poly(U)-зависимом связывании Phe-тРНК<sup>Phe</sup> 100%) [17] — В. И. Махно (ЛИЯФ АН СССР, г. Гатчина), фактор инициации IF2 [18] — И. Э. Целенсом (Институт органического синтеза АН ЛатвССР, Рига). Метку  $^{32}\text{P}$  в AUGU<sub>6</sub> вводили с помощью  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]АТР и Т4-полинуклеотидкиназы по [19].  $3'$ - $^{32}\text{P}$ Ср-тРНК получали присоединением  $^{32}\text{P}$ Ср к тРНК<sup>Phe</sup> с помощью Т4-РНК-лигазы по [20]. Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (1500 пмоль/л ОЕ<sub>260</sub>) и AcPhe-тРНК<sup>Phe</sup> (1300 пмоль/л ОЕ<sub>260</sub>) получали как описано в работах [21, 22], fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> (1300 пмоль/л ОЕ<sub>260</sub>) — как в работе [16]. Реагент Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub> был синтезирован по [7]. Остальные платиновые реагенты получены по [23].

Комплексы [70S рибосома · [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> · poly(U)] получали инкубацией рибосом (3 · 10<sup>-6</sup> М) с [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (1,2 · 10<sup>-6</sup> М) и poly(U) (20 ОЕ<sub>210</sub>/мл) при 0°С в буфере, рН 7,5, содержащем 40 мМ трис-НСl, 10 мМ Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 50 мМ KNO<sub>3</sub>, в течение 1 ч. По окончании инкубации смеси обрабатывали дифункциональными производными платины(II) (см. табл. 1) и выдерживали 40 мин при 20°С. Затем к реакционным смесям объемом по 50 мкл добавляли 0,1 М EDTA (рН 7,5) для снижения концентрации Mg<sup>2+</sup> до 1 мМ с целью разрушения комплекса и наносили на колонку с сефадексом G-200 (объемом 3 мл и высотой 12 см). Элюцию вели при 10°С буфером, содержащим 0,5 мМ Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 200 мМ ацетат аммония, 25 мМ трис-НСl, рН 7,5. Элюат фракционировали через проточную кювету микроколонного хроматографа «Миллхром» отечественного производства. Во фракциях пресчитывали радиоактивность.

Комплексы [70S рибосома · Ac[ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> · poly(U)] (1) и [70S рибосома ·  $3'$ - $^{32}\text{P}$ Ср-тРНК · poly(U)] (2) получали аналогично описанному выше для комплекса [70S рибосома · [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> · poly(U)], используя буфер, рН 7,5, содержащий 50 мМ трис-НСl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl. Комплексы [70S рибосома · f[ $^{35}\text{S}$ ] Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> · AUGU<sub>6</sub>] (3) и [70S рибосома · fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> ·  $^{32}\text{P}$ AUGU<sub>6</sub>] (3а) получали инкубацией предобразованного комплекса [30S-матрица · fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> · IF2 · GTP] с 50S субчастицами при 37°С в течение 15 мин в буфере, рН 7,5, содержащем 50 мМ трис-НСl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl. При получении комплекса (3) использовали следующие концентрации: рибосом — 0,93 мкМ, f[ $^{35}\text{S}$ ] Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> — 1,4 мкМ, AUGU<sub>6</sub> — 9,3 мкМ, GTP — 0,2 мМ, IF2 — 0,77 мг/мл; при получении комплекса (3а) концентрации рибосом, fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> и  $^{32}\text{P}$ AUGU<sub>6</sub> составляли 8,56 мкМ, IF2 — 2,8 мг/мл. Комплексы выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-200, элюция вели буфером, рН 6,5, содержащим 20 мМ какодлат калия, 10 мМ Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 75 мМ KNO<sub>3</sub>.

Выделенные комплексы обрабатывали 40 мин 0,4 мМ Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub> при 20°С. Связывание с рибосомами тРНК в комплексах (1)–(3) и  $^{32}\text{P}$ AUGU<sub>6</sub> в комплексе (3а) тестировали фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры.

Разделение 70S рибосом, обработанных Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub>, на субчастицы проводили после разрушения комплексов с помощью EDTA, как описано выше, центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в буфере состава: 20 мМ какодлат калия (рН 6,5), 10 мМ ацетат аммония, 0,5 мМ Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (центрифуга Beckman L-8M (СНА), ротор SW-27, 23000 об/мин, 17 ч, 4°С). Затем содержимое пробирок с градиентом концентрации сахарозы фракционировали с помощью микроколонного хроматографа «Миллхром».

Разделение рибосомных субчастиц на рНК и белки. Субчастицы, полученные после центрифугирования комплексов в градиенте концентрации сахарозы в условиях диссоциации, осаждали добавлением 0,8 объема этанола после доведения концент-

рации  $Mg^{2+}$  до 20 мМ, затем растворяли в буфере 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащем 1% SDS, 10 мМ EDTA и 6 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, и центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы (5–20%) в том же буфере, но содержащем 0,1% SDS и 2 мМ EDTA. Условия центрифугирования: центрифуга Beckman L-8M, ротор SW-40, 36 000 об/мин, 17 ч, 4° С. Содержимое пробирок фракционировали как описано выше.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brewer I. A., Noller H. F. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. № 18. P. 4310–4315.
2. Banjar Z. M., Hnilica L. S., Briggs R. C., Stein J., Stein G. // *Biophys. and Biochem. Res. Commun.* 1983. V. 114. № 2. P. 767–773.
3. Ciccarelli R. B., Solomon M. J., Varshavsky A., Lippard S. I. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 26. P. 7533–7540.
4. Тукало М. А., Рожко О. Т., Мацука Г. Х., Власов В. В., Казаков С. А. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 280. № 6. С. 1484–1487.
5. Lippard S. I., Hoeschel I. D. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. № 12. P. 6091–6095.
6. Kirillov S. V., Kemkhadze K. Sh., Makarov E. M., Makhno V. I., Odintsov V. B., Semenov Yu. P. // *FEBS Lett.* 1980. V. 120. № 2. P. 221–224.
7. Власов В. В., Казаков С. А., Мисовец В. Г. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 266. № 4. С. 866–870.
8. Babkina G. T., Vausk E. V., Graifer D. M., Karpova G. G., Matasova N. B. // *FEBS Lett.* 1984. V. 170. № 2. P. 290–294.
9. Kruse T. A., Siboska C. E., Clark B. F. C. // *Biochimie*. 1982. V. 64. № 4. P. 279–284.
10. Wrede P., Woo N. H., Rich A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. № 7. P. 3289–3293.
11. Sprinzl M., Gruter F., Gauss D. H. // *Nucl. Acids. Res.* 1978. V. 5. Suppl. r15–r28.
12. Бабкина Г. Т., Владимиров И. Н., Владимиров С. П., Карпова Г. Г., Циеленс И. Э. // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. Вып. 1. С. 93–101.
13. Бродде Н. Е., Медведева Н. И., Кусова К. С., Будовский Э. И. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. Вып. 5. С. 1269–1272.
14. Абдурашидова Г. Г., Наризян М. Г., Руденко Н. В., Турчинский М. Ф., Будовский Э. И. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. Вып. 2. С. 553–557.
15. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Матасова Н. Б., Берзинь В. М., Грен Э. Я., Циеленс И. Э. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. Вып. 4. С. 1079–1085.
16. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Берзинь В. М., Грен Э. Я., Циеленс И. Э., Вельяминова А. Г., Ренкова М. Н., Ямковой В. И. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 11. С. 1535–1543.
17. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P. // *Nucl. Acids. Res.* 1980. V. 8. № 1. P. 183–196.
18. Berzin V. M., Borisova G. F., Cielens I. E., Gribanov V. A., Jansone I., Rosenthal G., Gren E. J. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 119. № 1. P. 101–131.
19. Donniss-Keller H., Maxam A., Gilbert W. // *Nucl. Acids Res.* 1977. V. 4. № 8. P. 2527–2538.
20. Peattie D. A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. № 4. P. 1760–1764.
21. Kemkhadze K. Sh., Odintsov V. B., Semenov Yu. P., Kirillov S. V. // *FEBS Lett.* 1981. V. 125. № 1. P. 10–14.
22. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P. // *Nucl. Acids Res.* 1980. V. 8. № 1. P. 183–196.
23. Синтез комплексных соединений металлов платиновой группы. Справочник. М.: Наука, 1964. С. 2, 28, 29.

Поступила в редакцию  
20.X.1986

#### THE USE OF PLATINUM-CONTAINING CROSS-LINKING REAGENTS FOR INVESTIGATION OF tRNA- AND mRNA-RIBOSOME INTERACTIONS

VLADIMIROV S. N., GRAIFER D. M., ZENKOVA M. A.,  
KAZAKOV S. M., KARPOVA G. G., KONONOVA R. G.

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

The use of some bifunctional Pt(II) containing cross-linking reagents for investigation of structural organization of ribosomal tRNA- and mRNA-binding centres is demonstrated for various types of [70S ribosome-mRNA-tRNA] complexes. It is shown that treatment of the complexes [70S ribosome-Ac[ $^{14}C$ ]Phe-tRNA<sup>Phe</sup>-poly(U)], [70S ribosome-3'- $^{32}P$ Cp-tRNA<sup>Phe</sup>-poly(U)] and [70S ribosome-f[ $^{35}S$ ]Met-tRNA<sup>Met</sup>-AUGU<sub>6</sub>] with Pt(II)-derivatives results in covalent attachment of tRNA to ribosome. AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> and 3'-pCp-tRNA<sup>Phe</sup> bound at the P site were found to be cross-linked preferentially to 30S subunit. fMet-tRNA<sup>Met</sup> within the 70S initiation complex is cross-linked to both ribosome subunits approximately in the same extent, which exceeds two-fold the level of the tRNA<sup>Phe</sup> cross-linking. All used tRNA species were cross-linked in the comparable degree both to rRNA and proteins of both subunits in all types of the complexes studied.  $^{32}P$ AUGU<sub>6</sub> cross-links exclusively to 30S subunit (to 16S RNA only) within [70S ribosome- $^{32}P$ AUGU<sub>6</sub>-fMet-tRNA<sup>Met</sup>] complex. In the absence of fMet-tRNA<sup>Met</sup> the level of the cross-linking is 4-fold lower.