



УДК 577.217.34 : 577.113.6

© 1993 Д. А. Мундус, К. Н. Булыгин,  
А. Г. Веньяминова, Л. В. Врацких\*, М. А. Зенкова,  
А. А. Малыгин, М. Н. Репкова, В. И. Ямковой\*, Г. Г. Карпова

### АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ 40S РИБОСОМНЫХ СУБЧАСТИЦ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА АНАЛОГАМИ мРНК — ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ AUGU<sub>n</sub>C С АЛКИЛИРУЮЩЕЙ ГРУППОЙ НА 3'-КОНЦЕ

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения РАН;  
\* Новосибирский государственный университет

Изучена аффинная модификация 40S рибосомных субчастиц из плаценты человека 2',3'-O-(4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилиденowymi) производными олигорибонуклеотидов AUGU<sub>n</sub>C<sup>\*</sup> (C<sup>\*</sup> — цитидин-5'-[<sup>32</sup>P] фосфат, n = 0, 3). В составе комплексов с 40S субчастицами, полученных в присутствии Met-tРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> · eIF-2 · GTP, происходило ковалентное присоединение этих производных к субчастицам. Модификации подвергались белки и 18S рРНК в сопоставимой степени. Идентифицированы фрагменты 18S рРНК, внутри которых локализованы места ковалентного присоединения реагентов: фрагменты 1610—1747 и 1748—1869 для производного AUGC<sup>\*</sup> и фрагмент 593—673 для производного AUGU<sub>3</sub>C<sup>\*</sup>. Сравнение этих данных с полученными ранее при аффинной модификации 80S рибосом из плаценты человека аналогичными производными олигоуридилатов показало, что расположение кодона U<sub>3</sub> в мРНК-связывающем центре инициаторного комплекса 40S · производное AUGU<sub>3</sub>C<sup>\*</sup> · eIF-2 · GTP · Met-tРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> отличается от расположения этого же кодона в А-сайте комплекса, имитирующего претранслокационное состояние 80S рибосом.

Алкилирующие производные олигорибонуклеотидов — аналоги мРНК — ранее были успешно использованы для исследования структурно-функциональной топографии рибосом *Escherichia coli* (см., например, [1, 2]). Анализ рибосомных белков, подвергающихся модификации производными олигорибонуклеотидов в составе модельных комплексов, имитирующих различные функциональные состояния рибосом, позволил получить информацию не только о расположении мРНК на рибосоме, но и об изменении белкового окружения матрицы в процессе трансляции. Недавно с помощью производных олигоуридилатов разной длины, несущих алкилирующую группу на 5'- или 3'-конце, нами была изучена аффинная модификация 80S рибосом из плаценты человека в присутствии родственной тРНК [3—6]. В результате были идентифицированы фрагменты 18S рРНК, в пределах которых находились места ковалентного присоединения аналогов мРНК. С помощью производных олигорибонуклеотидов рAUGU<sub>n</sub> (n = 0, 3) с алкилирующей группой на 5'-конце нами была изучена аффинная модификация

Сокращения: C<sup>\*</sup> — цитидин-5'-[<sup>32</sup>P]фосфат, — CH<sub>2</sub>RCI и >CHRCI — 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилидная и 4-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилиденная группы, eIF-2 — фактор инициации.

40S рибосомных субчастиц из плаценты человека в составе инициаторного комплекса  $40S \cdot (\text{аналог мРНК}) \cdot eIF-2 \cdot GTP \cdot Met\text{-тРНК}_f^{Met}$  и были определены области 18S рРНК, внутри которых локализованы участки присоединения реагентов [7]. Сравнение результатов модификации 18S рРНК аналогами мРНК в составе претранслокационного комплекса 80S рибосом [5] и в составе инициаторного комплекса 40S субчастиц [7] показало, что большая субчастица не вносит заметных изменений в структурную организацию области кодон-антикодоновых взаимодействий, однако на расположение тринуклеотидной матрицы в донорном сайте существенно влияет наличие соседнего кодона в А-сайте (независимо от присутствия в нем тРНК).

В настоящей работе изучена аффинная модификация 40S рибосомных субчастиц из плаценты человека  $2',3'\text{-O-}\{4\text{-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилиденовыми}\}$  производными олигорибонуклеотидов  $AUGU_n\overset{*}{C} > CHRCI$  ( $n = 0, 3$ ) в составе 40S инициаторных комплексов. Идентифицированы фрагменты 18S рРНК, внутри которых локализованы места ковалентного присоединения аналогов мРНК.

Ранее было показано, что олигорибонуклеотиды рAUG и рAUGU<sub>3</sub>, а также их производные с алкилирующей группой на 5'-конце связываются с 40S субчастицами из плаценты человека в присутствии тройного комплекса  $eIF-2 \cdot GTP \cdot Met\text{-тРНК}_f^{Met}$  [7]. Связывание происходит в участке кодон-антикодоновых взаимодействий, модифицирующая группа при этом не приводит к заметному понижению сродства аналогов мРНК к 40S субчастицам. Аналоги мРНК  $AUG\overset{*}{C} > CHRCI$  и  $AUGU_3\overset{*}{C} > CHRCI$  также связываются с 40S субчастицами в присутствии тройного комплекса  $eIF-2 \cdot GTP \cdot Met\text{-тРНК}_f^{Met}$  (данные не приведены). Как и следовало ожидать (см. [6]), наличие бензилиденовой группировки в аналоге мРНК не препятствовало существенно кодон-антикодонному взаимодействию на 40S субчастицах. В отсутствие тройного комплекса  $eIF-2 \cdot GTP \cdot Met\text{-тРНК}_f^{Met}$  связывание  $AUGU_n\overset{*}{C} > CHRCI$  с 40S субчастицами практически не наблюдалось.

Для алкилирования 40S субчастиц соответствующие инициаторные комплексы выдерживали при 25° С в течение времени, соответствующего примерно двум периодам полупревращения реагентов в активную промежуточную частицу [6]. В контрольном эксперименте было показано, что диссоциация аналогов матрицы из комплексов за время инкубации в условиях алкилирования не происходит (данные не приведены). Степени связывания  $AUGU_n\overset{*}{C} > CHRCI$  с 40S субчастицами, определенные после инкубации соответствующих комплексов в условиях алкилирования (25° С, 28 ч), практически не отличались от степеней связывания, найденных после инкубации в этих же условиях в течение 10 мин (см. также [6, 7]). После проведения реакции комплексы разрушали и анализировали включение метки <sup>32</sup>P в 40S субчастицы центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (таблица).

Видно, что модификация 40S субчастиц значительно подавляется в присутствии 50-кратного избытка немодифицированного олигорибонуклеотида и практически не наблюдается в отсутствие тройного комплекса  $eIF-2 \cdot GTP \cdot Met\text{-тРНК}_f^{Met}$ . Следовательно, алкилирование рибосом  $AUGU_n\overset{*}{C} > CHRCI$  протекает в составе специфического комплекса в области кодон-антикодоновых взаимодействий (с 3'-стороны), модификации 40S субчастиц избытком реагента из раствора (вне комплекса) не происходит.  $AUGU_n\overset{*}{C} > CHRCI$  присоединяется к 40S субчастицам с достаточно высокой эффективностью. Так, принимая во внимание, что степени связывания  $AUG\overset{*}{C} > CHRCI$  и  $AUGU_3\overset{*}{C} > CHRCI$  с 40S субчастицами составляли 1,5 и 0,8 пмоль на 10 пмоль 40S субчастиц соответственно, легко видеть, что примерно 58% связанного в комплекс  $AUG\overset{*}{C} > CHRCI$  и 18% —  $AUGU_3\overset{*}{C} > CHRCI$  кова-

Реагент	Добавляемые компоненты				Ковалентно присоединенный реагент, пмоль/10 пмоль 40S
	eIF-2	Met-tRNA <sub>f</sub> <sup>Met</sup>	GTP	AUGU <sub>n</sub>	
AUGC* > CHRCI	+	+	+	—	0,87
	—	+	+	—	0,19
	+	+	+	+	0,11
	—	—	+	—	<0,01
AUGU <sub>3</sub> C* > CHRCI	+	+	+	—	0,15
	—	+	+	—	0,07
	+	+	+	+	0,01
	—	—	+	—	<0,01

лентно присоединялось к рибосомам. С учетом степени ионизации C—Cl-связи реагентов за время инкубации (~75%) можно заключить, что ~77% AUGC\* > CHRCI и 24% AUGU<sub>3</sub>C\* > CHRCI от общего количества реагента, связанного в комплекс, расходовалось на алкилирование 40S субчастиц.

Для анализа распределения радиоактивной метки между рРНК и белками рибосомные субчастицы разделяли на фракции рРНК и белков центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (5—20%) в буфере, содержащем додецилсульфат натрия. Было установлено, что модификации подвергаются как белки, так и 18S тРНК в соотношении 60 : 40 и 56 : 44 для реагентов AUGC\* > CHRCI и AUGU<sub>3</sub>C\* > CHRCI соответственно.

Идентификацию фрагментов 18S рРНК, внутри которых расположены места ковалентного присоединения аналогов мРНК, проводили с помощью блот-гибридизации модифицированной 18S рРНК, несущей метку <sup>32</sup>P, с фрагментами рестрикции плазмиды рHr13, содержащей полные последовательности рибосомных РНК из плаценты человека. С помощью рестриктаз *Sal*I и *Kpn*I из плазмиды был вырезан фрагмент (длиной 3200 п.о.), содержащий полную копию 18S рРНК, а также часть внутреннего и внешнего транскрибируемых спейсеров. Этот фрагмент (рДНК) был гидролизован в четырех параллельных экспериментах рестриктазами *Msp*I, *Alu*I, *Sau*3A и *Hae*III. Образовавшиеся фрагменты были разделены электрофорезом в полиакриламидном геле и иммобилизованы на капроновой мембране. Блот-гибридизация фрагментированной с помощью ограниченного щелочного гидролиза (0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,9, 90°С, 15 мин) модифицированной 18S рРНК с фрагментами рестрикции рДНК подробно описана в работах [3—5, 7]. На рис. 1 приведен радиоавтограф мембраны с фрагментами рДНК, гибридованными с 18S рРНК, модифицированной AUGC\* > CHRCI и AUGU<sub>3</sub>C\* > CHRCI.

Идентификацию областей 18S рРНК, содержащих участки ковалентного присоединения аналогов мРНК, проводили, сопоставляя размеры гибридуемых фрагментов (рис. 1) с картой рестрикции рДНК (см. работы [3—5]) и с последовательностью 18S рРНК из плаценты человека [8]. Следует отметить, что первичная структура внутреннего и внешнего транскрибируемых спейсеров неизвестна, поэтому невозможно определить те фрагменты рестрикции, которые соответствуют 3'- и 5'-концам молекулы 18S рРНК, что составляет ~100 нуклеотидов с каждого из концов.

В результате проведенного анализа было установлено, что участок алкили-

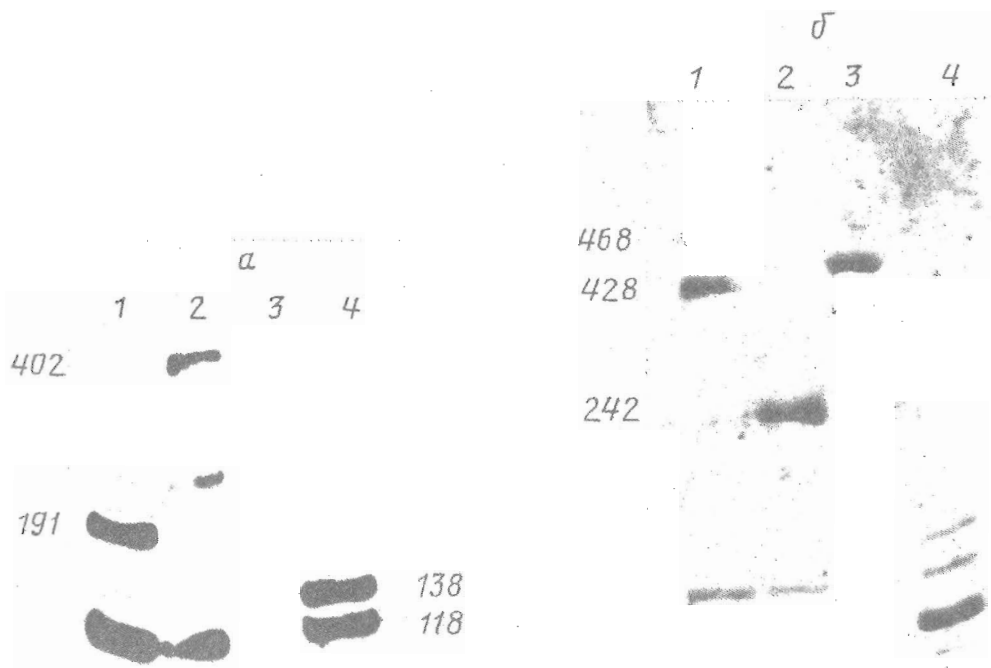


Рис. 1. Блот-гибридизация по Саузерну меченных  $^{32}\text{P}$  продуктов частичного щелочного гидролиза 18S рРНК, модифицированной  $\text{AUGC}^* > \text{CHRCI}$  (а) и  $\text{AUGU}_3\text{C}^* > \text{CHRCI}$  (б), с фрагментами рДНК, полученными с помощью эндонуклеаз рестрикции *Msp* I (1), *Hae* III (2), *Alu* I (3) и *Sau*3A (4)

рования 18S рРНК  $\text{AUGU}_3\text{C}^* > \text{CHRCI}$  находится в области 593—673, а места модификации  $\text{AUGC}^* > \text{CHRCI}$  расположены в 3'-концевой части молекулы 18S рРНК внутри двух примыкающих друг к другу фрагментов в положениях 1610—1747 и 1748—1869. Кроме того, в случае  $\text{AUGC}^* > \text{CHRCI}$  наблюдались «слабые» полосы на радиоавтографе, характерные для фрагментов рДНК, гибридных с 18S рРНК, модифицированной  $\text{AUGU}_3\text{C}^* > \text{CHRCI}$ , а в случае  $\text{AUGU}_3\text{C}^* > \text{CHRCI}$  — «слабые» полосы, соответствующие основным фрагментам рДНК, найденным в опыте с  $\text{AUGC}^* > \text{CHRCI}$ . Следовательно, в случае  $\text{AUGU}_3\text{C}^* > \text{CHRCI}$  происходила «слабая» модификация 18S рРНК в области 1610—1869, а в случае  $\text{AUGC}^* > \text{CHRCI}$  — внутри фрагмента 593—673.

Ранее внутри фрагментов 1610—1747 и 1748—1869 нами были локализованы участки модификации 18S рРНК  $(\text{Up})_{n-1}\text{UC}^* > \text{CHRCI}$  ( $n = 6, 12$ ) в составе комплексов 80S рибосом из плаценты человека, стабилизированных кодон-антикодонным взаимодействием одновременно в Р- и А-сайтах, т. е. в составе комплексов, имитирующих претранслокационное состояние рибосом [6]. Поэтому можно предположить, что расположение 3'-концевого фрагмента  $\text{AUGC}^* > \text{CHRCI}$  в 40S инициаторном комплексе в общем совпадает с расположением 3'-концевой части  $(\text{Up})_{n-1}\text{UC}^* > \text{CHRCI}$  ( $n = 6, 12$ ) в претранслокационном комплексе. Тем не

менее наличие слабой модификации внутри фрагмента 593—673 в случае  $AUG\dot{C}^* > CHRCI$  (не наблюдавшейся ранее в случае  $(U_p)_{n-1}U\dot{C}^* > CHRCI$  [6]) указывает на некоторые различия в расположении этих аналогов мРНК относительно 18S рРНК.

Резкие различия в направленности модификации, выявленные для реагентов  $AUGU_3\dot{C}^* > CHRCI$  и  $(pU)_5U\dot{C}^* > CHRCI$  [6], свидетельствуют о существенных изменениях в расположении кодона  $U_3$ , находящегося с 3'-стороны от донорного сайта в 40S инициаторном комплексе, по сравнению с расположением того же кодона в А-сайте претранслокационного комплекса. В то же время окружение 5'-концевого фрагмента  $CIRCH_2N(CH_3)pAUGU_3$  в 40S инициаторном комплексе [7] совпадает с окружением  $CIRCH_2N(CH_3)(pU)_6$ , фиксированного на 80S рибосоме кодон-антикодоновым взаимодействием одновременно в Р- и А-сайтах [5]. Различия в расположении  $AUGU_3\dot{C}^* > CHRCI$  и  $(pU)_5U\dot{C}^* > CHRCI$  относительно 18S рРНК могут быть объяснены недостаточной жесткой фиксацией кодона  $U_3$  в мРНК-связывающем центре 40S инициаторного комплекса, с одной стороны, и наличием кодон-антикодового взаимодействия в А-сайте претранслокационного комплекса — с другой. Слабая модификация 18S рРНК в области 1610—1869, наблюдаемая для  $AUGU_3\dot{C}^* > CHRCI$ , по-видимому, происходит в комплексах (доля которых невелика), в которых расположение 3'-концевого фрагмента матрицы ( $U_3C > CHRCI$ ) относительно 18S рРНК такое же, как в комплексе  $80S \cdot \text{тРНК}^{Phe}(\text{Р-сайт}) \cdot \text{Phe}_2\text{-тРНК}^{Phe}(\text{А-сайт}) \cdot (U_p)_5UC > CHRCI$ .

Данные по расположению мРНК на рибосомах эукариот практически отсутствуют, за исключением предыдущих работ по аффинной модификации рибосом из плаценты человека алкилирующими производными олигорибонуклеотидов, выполненных в нашей лаборатории [3—7]. Для рибосом *E. coli* имеется достаточно данных, которые могут быть сопоставлены с результатами, полученными в настоящей работе. Так, 3'-концевому фрагменту 1610—1869 18S рРНК человека соответствует фрагмент 1310—1542 в 16S рРНК *E. coli*. В этой области находится основание  $C^{1400}$ , сшивающееся с 5'-антикодовым основанием тРНК [9, 10], и участок 1394—1399, сшивающийся с синтетической матрицей poly(A) в присутствии родственной тРНК<sup>Lys</sup> [11].

При аффинной модификации рибосом *E. coli* реагентом  $(U_p)_6U > CHRCI$  было обнаружено, что один из участков модификации 16S рРНК находится на расстоянии примерно 110 нуклеотидов от 3'-конца [12], что соответствует положению 1432 в этой рРНК. Фрагмент 593—673 в 18S рРНК соответствует высококонсервативной области 530-«stem-loop» в 16S рРНК, которая, как предполагается [13, 14], вовлечена во взаимодействие с тРНК и/или мРНК. В этой же области 16S рРНК находится основание  $A^{532}$ , сшивающееся с фотоактивируемыми аналогами мРНК, несущими остатки тиоуридина [15]. Более того, имеются данные, позволяющие отнести указанные районы 16S рРНК именно к 3'-зоне участка кодон-антикодовых взаимодействий. Так, ряд нуклеотидных остатков 16S рРНК, расположенных в районе 1400—1500 и в области 530-«stem-loop», защищаются от химической модификации при связывании тРНК в А-сайте рибосом [16, 17]. Поэтому есть все основания полагать, что области 1610—1869 и 593—673 18S рРНК, соответствующие вышеуказанным районам 16S рРНК, участвуют в организации 3'-зоны участка кодон-антикодовых взаимодействий в рибосомах эукариот.

На рис. 2 отмечены фрагменты 18S рРНК, внутри которых локализованы места ковалентного присоединения аналогов мРНК — алкилирующих производных  $AUGU_n$  и олигоуридилатов. Видно, что идентифицированные нами фрагменты расположены в разных частях молекулы 18S рРНК. Однако на моделях третичной структуры 16S рРНК в составе 30S субчастицы [11, 19] участки 16S рРНК, соответствующие фрагментам 18S рРНК, в пределах которых находятся места присоединения реагентов, сближены (области 975—1164 18S рРНК, внутри которой

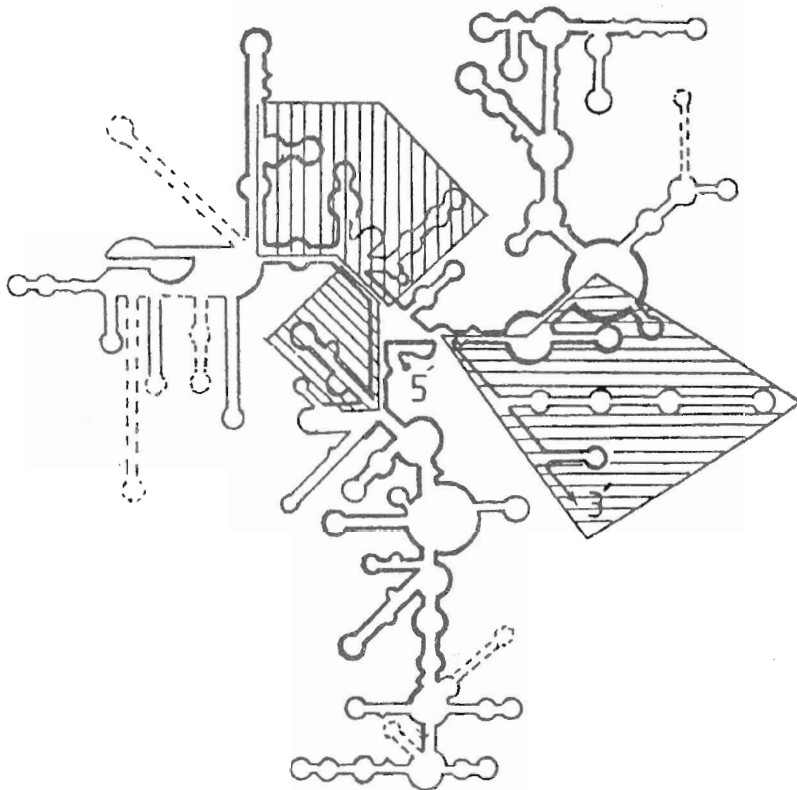


Рис. 2. Модель вторичной структуры рРНК малой субчастицы рибосом эукариот [18]. Относительно консервативные участки отмечены жирной линией, вариабельные участки — тонкой линией, штриховой — участки, встречающиеся лишь в некоторых из известных структур. Области рРНК, содержащие участки модификации, отмечены горизонтальной штриховкой для  $(UP)_{n-1}UC^* > CHRCI$  ( $n = 6, 12$ ) [6] и  $AUGC^* > CHRCI$ , вертикальной — для  $CIRCH_2N(CH_3)(pU)_n$  ( $n = 3, 6$ ) [5] и  $CIRCH_2N(CH_3)pAUGU_n$  ( $n = 0, 3$ ) [7], наклонной — для  $AUGU_3C^* > CHRCI$

расположены участки модификации производными олигорибонуклеотидов с алкилирующей группой на 5'-конце [3—5, 7], соответствуют положения 707—896 16S рРНК). Можно полагать, что в составе 40S субчастицы соответствующие районы 18S рРНК, формирующие 5'- и 3'-зоны области кодон-антикодоновых взаимодействий, также сближены.

### Экспериментальная часть

В работе использовали АТФ, ГТФ, креатинфосфат и креатинфосфокиназу (Sigma, США),  $[^{35}S]$ метионин (320 Ки/ммоль, ХОП «Радиопрепарат», Ташкент), суммарную тРНК из плаценты человека (химический завод, Омутнинск), щелочную фосфатазу (Boehringer Mannheim, ФРГ), РНКазу А (НПО «Биолар», Латвия), ферменты рестрикции *Sal* I, *Kpn* I, *Sau*3A, *Alu* I, *Msp* I, *Hae* III (НПО «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.), капроновую мембрану с диаметром пор 0,2 мкм (экспериментальная лаборатория Хийу Калур, Эстония), плазмиду рTZ18U (Sigma, США). Плазида рHr13 была любезно предоставлена проф. Б. Е. Маденом (Великобритания).  $[^{32}P]$ рСр ( $Cp$ ) (450 Ки/ммоль) был синтезирован В. Карамышевым. РНК-лигаза фага Т4 была выделена по методу, описанному

в работе [20]. Суммарную тРНК из плаценты человека, обогащенную по тРНК<sup>Met</sup> (150—200 пмоль/ОЕ<sub>260</sub>), получали с помощью обращенно-фазовой хроматографии по методу [21]. Аминоацилирование суммарной и обогащенной тРНК радиоактивным или нерадиоактивным метионином проводили как описано в работе [22]. Аминоацилированную тРНК выделяли из реакционной смеси ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе и осаждали этанолом. Фактор инициации eIF-2 из ретикулоцитов кролика любезно предоставлен С. Смаиловым (Институт молекулярной биологии и биохимии, Алма-Ата). 40S рибосомные субчастицы выделяли как описано в работе [23].

4-[N-Метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензальдегид был любезно предоставлен Т. М. Ивановой. Олигорибонуклеотиды AUG и AUGU<sub>3</sub> были синтезированы по методам, описанным в работах [24, 25], и выделены ионообменной хроматографией. Метки <sup>32</sup>P в олигорибонуклеотиды AUG и AUGU<sub>3</sub> вводили с помощью РНК-лигазы фага T4 и <sup>32</sup>P по методике [6]. Меченые олигорибонуклеотиды выделяли обращенно-фазовой хроматографией и дефосфорилировали с помощью щелочной фосфатазы.

Синтез AUG<sub>3</sub><sup>\*</sup> > CHRCI и AUGU<sub>3</sub><sup>\*</sup> > CHRCI проводили согласно работе [26]. Степень превращения олигорибонуклеотидов в бензилиденновые производные составляла более 90%. Удельная активность полученных препаратов AUG<sub>3</sub><sup>\*</sup> > CHRCI и AUGU<sub>3</sub><sup>\*</sup> > CHRCI на момент выделения их из реакционной смеси обращенно-фазовой хроматографией составляла (3—4) · 10<sup>4</sup> имп/мин · пмоль по Черенкову.

Инициаторные комплексы 40S субчастица · AUGU<sub>n</sub><sup>\*</sup> > CHRCI · eIF-2 · GTP · Met-тРНК<sup>Met</sup> получали согласно [7]. Аффинную модификацию 40S субчастиц AUGU<sub>n</sub><sup>\*</sup> > CHRCI проводили, инкубируя 40S инициаторные комплексы при 25° С в течение 28 ч. В препаративных опытах использовали до 180 пмоль 40S субчастиц и соответствующие количества остальных компонентов (см. [7]). Модифицированные 40S субчастицы выделяли в градиенте плотности сахарозы (10—30%) по методикам [3—5]. Анализ модификации рРНК и белков в 40S субчастицах проводили центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (5—20%) в буфере, содержащем додецилсульфат натрия по методике, описанной в работе [27]. Выделение 18S рРНК из модифицированных 40S субчастиц и идентификацию фрагментов 18S рРНК, содержащих участки ковалентного присоединения реагентов, проводили как описано в работах [3—7].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gimautdinova O. I., Karpova G. G., Knorre D. G., Kobetz N. D. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 14. P. 3465—3481.
2. Vladimirov S. N., Babkina G. T., Venjaminova A. G., Gimautdinova O. I., Zenkova M. A., Karpova G. G. // Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1048. № 2/3. P. 245—256.
3. Graifer D. M., Zenkova M. A., Malygin A. A., Mamaev S. V., Mundus D. A., Karpova G. G. // J. Mol. Biol. 1990. V. 214. № 1. P. 121—128.
4. Грайфер Д. М., Зенкова М. А., Малыгин А. А., Мамаев С. В., Мундус Д. А., Карпова Г. Г. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 88—98.
5. Малыгин А. А., Грайфер Д. М., Зенкова М. А., Мамаев С. В., Карпова Г. Г. // Молекулярная биология. 1992. Т. 26. № 2. С. 130—138.
6. Бульгин К. Н., Грайфер Д. М., Зенкова М. А., Малыгин А. А., Ямковой В. И., Карпова Г. Г. // Молекулярная биология. 1992. Т. 26. № 4. С. 821—829.
7. Мундус Д. А., Малыгин А. А., Зенкова М. А., Репкова М. Н., Веньяминова А. Г., Смаилов С. К., Ли А. В., Исхаков Б. К., Врацких Л. В., Ямковой В. И., Карпова Г. Г. // Молекулярная биология. 1992. Т. 26. № 4. С. 949—956.
8. Maden B. E. H., Dent C. L., Farrel T. E., Garde J., McCallum F. S., Wakeman J. A. // Biochem. J. 1987. V. 246. № 3. P. 519—522.

9. Ofengand J., Gornicki P., Chakraborty K., Nurse K.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 9. P. 2817—2821.
10. Prince J. B., Taylor B. H., Thurlow D. L., Ofengand J., Zimmerman R. A.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 18. P. 5450—5454.
11. Stiege W., Stade K., Schüler D., Brimacombe R.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 6. P. 2369—2387.
12. Карпова Г. Г., Кобец Н. Д., Силина С. А., Годовиков А. А.//Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 10. С. 1503—1511.
13. Trifonov E. N.//J. Mol. Biol. 1987. V. 194. № 2. P. 643—652.
14. Powers T., Noller H. F.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 3. P. 1042—1046.
15. Wollenzien P., Expert-Bezançon A., Favre A.//Biochemistry. 1991. V. 30. № 7. P. 1788—1795.
16. Moazed D., Noller H. F.//Cell. 1986. V. 47. № 6. P. 985—994.
17. Moazed D., Noller H. F.//Nature. 1989. V. 349. № 6246. P. 142—148.
18. Neefs J. M., Van de Peer Y., Hendriks L., DeWachter R.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. Supplement. P. 2237—2242.
19. Brimacombe R., Atmadja J., Stiege W., Schüler D.//J. Mol. Biol. 1988. V. 199. № 1. P. 115—136.
20. Врацких Л. В., Ямковой В. И.//Ферменты микроорганизмов и деградация биополимеров. М.: ВНИИСЭНТИ, 1990. С. 122—134.
21. Булычев Н. В., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Лебедев А. В.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 27—30.
22. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Берзинь В. А., Грен Э. Я., Циеленс И. Э., Веньяминова А. Г., Репкова М. Н., Ямковой В. И.//Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 11. С. 1535—1543.
23. Грайфер Д. М., Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Малыгин А. А., Матасова Н. Б.//Молекулярн. биология. 1990. Т. 24. № 4. С. 1076—1083.
24. Веньяминова А. Г., Владимиров С. Н., Дрыга С. А., Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Ямковой В. И.//Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 321—332.
25. Веньяминова А. Г., Горн В. В., Зенкова М. А., Комарова Н. И., Репкова М. Н.//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 941—950.
26. Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С., Мамаев С. В., Назарова Ю. Н., Федорова О. С.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 470—481.
27. Kruse T. A., Siboska G. E., Clark B. C.//Biochimie. 1982. V. 64. № 2. P. 279—284.

Поступила в редакцию  
11.VI.1992

После доработки  
29.IX.1992

D. A. Mundus, K. I. Balygin, A. G. Venjaminova, L. V. Vratskikh\*,  
M. A. Zenkova, A. A. Malygin, M. N. Repkova, V. I. Yamkovoy\*, G. G. Karpova

AFFINITY LABELLING OF HUMAN PLACENTA 40S RIBOSOMAL SUBUNITS BY mRNA  
ANALOGUES — DERIVATIVES OF OLIGORIBONUCLEOTIDES AUGU<sub>n</sub>C WITH AN  
ALKYLATING GROUP AT 3'-END

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;*  
\* *Novosibirsk State University, Novosibirsk*

Using 2',3'-O-[4-N-(2-chloroethyl)-N-methylamino]benzylidene derivatives of AUGU<sub>n</sub>[<sup>32</sup>P]pC (mRNA analogues), affinity labelling of human placenta 40S ribosomal subunits has been investigated in model initiation complexes obtained in the presence of the ternary complex eIF-2·GTP·Met-tRNA<sup>Met</sup>. The regions of 18S rRNA labelled with these mRNA analogues were identified. The main targets of 18S rRNA alkylation by the derivative of AUG[<sup>32</sup>P]pC were located within positions 1610—1747 and 1748—1869. The site of covalent attachment of AUGU<sub>3</sub>[<sup>32</sup>P]pC derivative to 18S rRNA was found within positions 593—673. Taking into account the data on labelling of human placenta ribosomes with the same derivatives of oligouridylicates obtained previously, the conclusion was made that the arrangement of the codon U<sub>3</sub> in the mRNA-binding centre of the initiation complex 40S·AUGU<sub>3</sub>[<sup>32</sup>P]pC derivative·eIF-2·GTP·Met-tRNA<sup>Met</sup> differs from the arrangement of the same codon at the A-site of the complex imitating the pretranslocation state of ribosomes.