



УДК 577.217.34

## РАСПОЛОЖЕНИЕ МАТРИЦЫ НА РИБОСОМЕ ЧЕЛОВЕКА: ОКРУЖЕНИЕ НУКЛЕОТИДА мРНК, ПРИМЫКАЮЩЕГО С 3'-СТОРОНЫ К КОДОНУ В А-УЧАСТКЕ

© 2005 г. Н. А. Демешкина, В. А. Стяжкина, К. Н. Булыгин,  
М. Н. Репкова, А. Г. Веньямина, Г. Г. Карпова<sup>#</sup>

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090,  
Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 20.09.2004 г. Принята к печати 28.10.2004 г.

С помощью метода химического аффинного сшивания определены нуклеотиды 18S рРНК, сближенные в 80S рибосоме с нуклеотидом матрицы, примыкающим к кодону в А-участке с 3'-стороны (т.е. с нуклеотидом в положении +7 относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке). Для этого использованы фотоактивируемые аналоги мРНК с перфторфенилазидогруппой, присоединенной через различные линкерные группировки к атому С5 остатка уридина, 3'-концевому фосфату или атому N7 остатка гуанозина. Положение аналогов мРНК на рибосоме задавали с помощью тРНК<sup>Phe</sup>, узнающей фенилаланиновый кодон, направляемый в Р-участок. Анализ рРНК, выделенной из облученных комплексов 80S рибосом, показал, что все аналоги примерно в одинаковой степени сшиваются с нуклеотидами 18S рРНК, которые нами были отнесены к окружению кодона в А-участке, а именно, с нуклеотидами А1823, А1824 и А1825 3'-мини-домена и фрагментом 620–630 5'-домена 18S рРНК. Кроме того, с помощью аналогов, несущих перфторфенилазидогруппу на остатках уридина и гуанозина, выявлен новый компонент мРНК-связывающего центра рибосом человека – нуклеотид С1698, относящийся к 3'-мини-домену 18S рРНК.

*Ключевые слова:* 80S рибосома, фотоаффинное сшивание, аналог мРНК, рибосомная РНК, эукариоты.

### ВВЕДЕНИЕ

Для понимания молекулярных механизмов процесса трансляции (биосинтеза белка) необходимо иметь детальную информацию о структурно-функциональной организации главного компонента аппарата трансляции – рибосомы. К настоящему времени накоплена богатая информация о рибосомах прокариот [1–5], в то время как рибосомы эукариот изучены в меньшей степени. По-видимому, это связано с тем, что многие методы, используемые для изучения бактериальных рибосом, пока не применимы к эукариотическим рибосомам. В частности, до сих пор не получены кристаллы 80S рибосом, пригодные для исследования методом рентгеноструктурного анализа (РСА), а также не найдено подходов к сборке активных рибосомных субчастиц эукариот из рРНК и белков в системе *in vitro*. Поэтому, пожалуй, единственным подходом, с помощью которого в настоящее время может быть получена детальная информация о структурно-функциональной

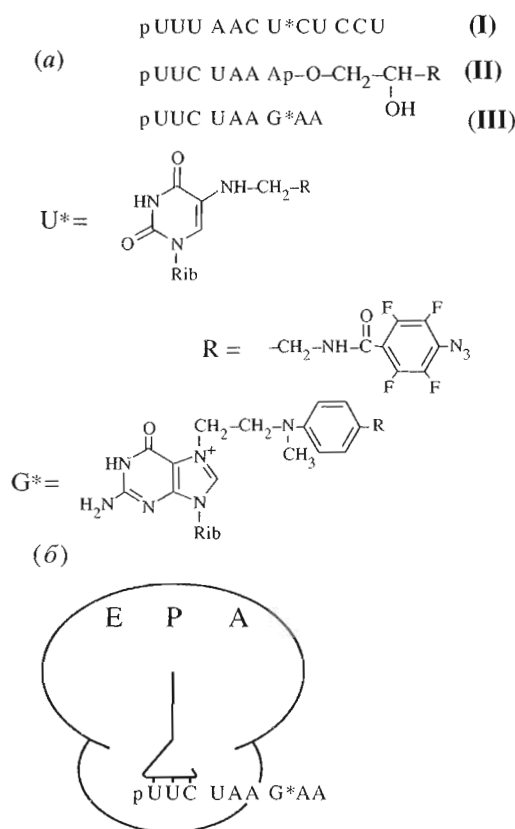
топографии рибосом эукариот, является метод аффинного химического сшивания (или аффинной модификации), основанный на применении реакционноспособных лигандов рибосомы.

Этот подход ранее плодотворно применяли для изучения рибосом прокариот (для обзора см. [6, 7]). К настоящему моменту с его помощью с использованием набора аналогов мРНК, коротких олигорибонуклеотидов с различным типом сшивающих групп и разной природой нуклеотидов, несущих эти группы, изучено строение мРНК-связывающего центра рибосом человека [8–13]. А именно, определены нуклеотиды 18S рРНК и рибосомные белки, сближенные с каждым из нуклеотидов кодонов матрицы в А-, Р- и Е-участках (т.е. с нуклеотидами мРНК в положениях от +6 до –3 относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке) [8–12]. Кроме того, установлены структурные элементы рибосомы человека, окружающие часть матрицы, расположенную с 5'-стороны от кодона в Е-участке [12, 13].

Анализ данных по аффинной модификации рибосом человека реакционноспособными аналогами мРНК показал, что результаты сшивков могут зависеть как от типа сшивающей группы, так и от природы нуклеотида, несущего эту группу. Так, например, в случае аналога мРНК с пер-

Сокращения: РСА – рентгеноструктурный анализ; oligo(dN) – олигодезоксирибонуклеотид; НЕРЕС – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (3832) 35-62-29; эл. почта: karpova@niboch.nsc.ru).



**Рис. 1.** Аналоги мРНК (I)–(III) (а), использованные для аффинной модификации в составе модельных комплексов 80S рибосом человека с тРНК<sup>Phe</sup> (б). R – реакцияноспособная группа; U\* и G\* – модифицированные остатки уридина и гуанозина.

фторфенилазидогруппой на атоме С5 остатка уридина в комплексе, где этот остаток находился в положении +1, сшивка происходила с нуклеотидом G1207 18S рРНК [14], а в случае аналога мРНК с такой же группой на атоме N7 остатка гуанозина в том же положении модификация подвергался G1702 [15]. Когда перфторфенилазидогруппа находилась на атоме N7 остатка гуанозина в положении +5 или +6, наблюдали модификацию нуклеотидов G626, A1823, A1824 и A1825 18S рРНК, аналогичная группа на атоме С5 остатка уридина также “дотягивалась” до нуклеотидов A1823, A1824 и A1825, но не затрагивала нуклеотида G626 [9]. Таким образом, очевидно, что для получения наиболее полной информации об окружении нуклеотидов мРНК на рибосоме целесообразно использовать набор аналогов мРНК, которые отличались бы природой нуклеотида, несущего сшивающую группу, и местом присоединения этой группы к нуклеотиду.

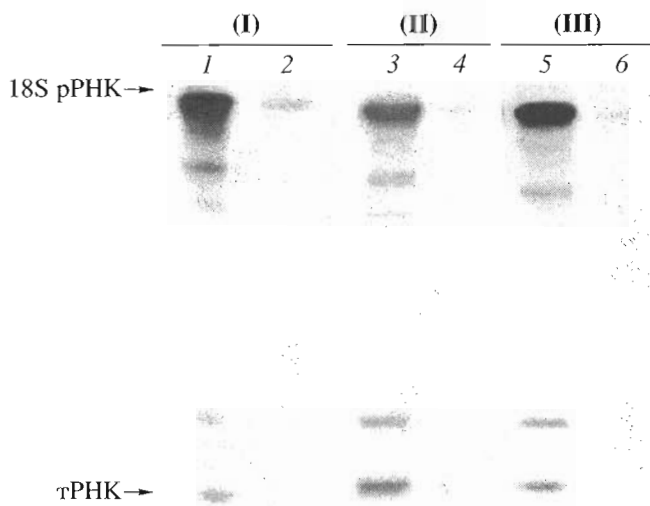
Целью настоящей работы являлось определение нуклеотидов рРНК, соседствующих с нуклеотидом матрицы, примыкающим с 3'-стороны к кодону в А-участке 80S рибосомы (т.е. с нуклеотидом мРНК в положении +7). Для этого были использо-

ваны три аналога мРНК, производные олигорибонуклеотидов рUUUAACUCUCCU, рUUCUAAAр и рUUCUAAAGAA, несущих одну и ту же перфторфенилазидогруппу на атоме С5 остатка уридина в седьмом положении, 3'-концевом фосфате и атоме N7 остатка гуанозина соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аналоги мРНК с перфторфенилазидогруппой, присоединенной к остатку уридина (I), 3'-концевому фосфату (II) или остатку гуанозина (III), использованные в работе, представлены на рис. 1а. Фотоаффинную модификацию 80S рибосом проводили в составе модельных комплексов, в которых модифицированный нуклеотид аналога мРНК находился в положении +7 относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке (рис. 1б). Расположение аналога мРНК на рибосоме задавали с помощью тРНК<sup>Phe</sup>, направлявшей кодон UUU или UUC в Р-участок, к которому все виды тРНК в любой форме в отсутствие факторов трансляции имеют наибольшее сродство [16, 17]. Таким образом, в комплексе, образованном с участием аналога (I), в А-участке оказывался смысловой кодон AAC, а в комплексах, полученных в присутствии аналогов (II) и (III), – стоп-кодон UAA. Ранее было показано, что окружение кодона в А-участке 80S рибосомы не зависит от того, какого типа этот кодон (смысловый или терминирующий) [9]. Следовательно, все три комплекса 80S рибосом, полученные в присутствии аналогов мРНК (I)–(III) и тРНК<sup>Phe</sup>, отличались лишь пространственной ориентацией сшивающей группы, расположенной на нуклеotide матрицы в положении +7. В каждом случае контролем служил бинарный комплекс аналога с 80S рибосомами.

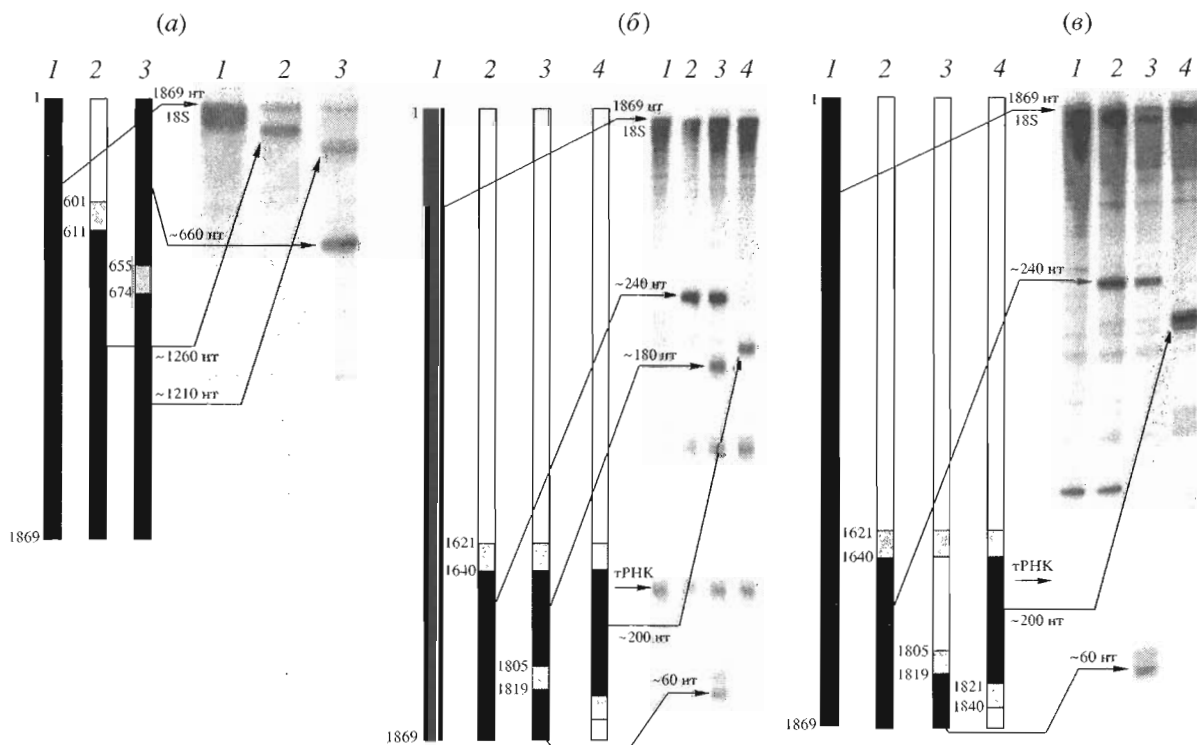
Для образования сшивок все комплексы облучали мягким УФ-светом, затем из комплексов выделяли суммарную РНК и анализировали ее с помощью гель-электрофореза. Анализ модифицированной рРНК электрофорезом в 1%-ной агарозе показал, что все три аналога мРНК сшиваются исключительно с 18S рРНК, в то время как 28S рРНК остается немодифицированной (соответствующий радиоавтограф не приведен). Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее для других аналогов мРНК, которые также сшивались в основном с 40S субчастицей [18–20]. Сшивка аналогов мРНК (I)–(III) с 18S рРНК происходила только в комплексах, образованных в присутствии тРНК; в бинарных комплексах модификации 18S рРНК практически не наблюдали (рис. 2, сравни дорожки 1, 3 и 5 с дорожками 2, 4 и 6), что свидетельствует о специфичности сшивок аналогов мРНК с 18S рРНК (т.е. о том, что модификация рРНК происходила в комплексах, где модифицированный нуклеотид аналога находился в положении +7). Эффективность сшивки с 18S



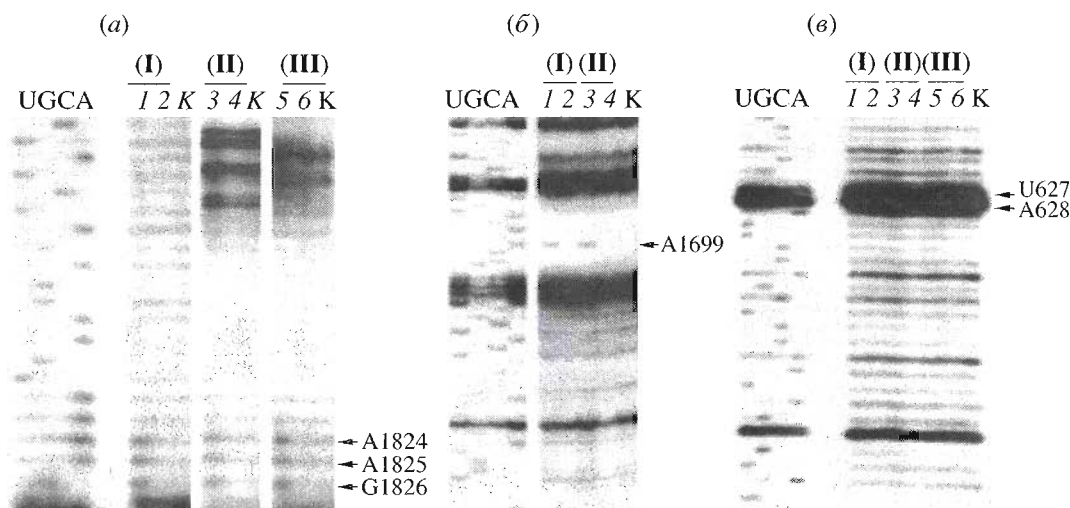
**Рис. 2.** Анализ с помощью электрофореза в 5% ПААГ в денатурирующих условиях шивки аналогов (I)–(III) с РНК в составе тройных (1, 3, 5) и бинарных (2, 4, 6) комплексов с 80S рибосомами (радиоавтограф).

рРНК практически не зависела от природы нуклеотида, несущего швивающую группу. Кроме того, все три аналога швивались также в незначительной степени с тРНК (рис. 2, дорожки 1, 3 и 5).

Фрагменты 18S рРНК, содержащие участки шивок с аналогами мРНК, определяли с помощью расщепления модифицированной рРНК РНКазой Н в присутствии oligo(dN), комплементарных определенным участкам 18S рРНК. Продукты расщепления разделяли электрофоретически с последующим окрашиванием и радиоавтографированием гелей. На рис. 3а в качестве примера представлены данные для 18S рРНК, модифицированной аналогом (I). Видно, что при расщеплении 18S рРНК в присутствии oligo(dN), комплементарного последовательности 601–611, вся метка оказывалась в длинном фрагменте (рис. 3а, дорожка 2), тогда как после расщепления в присутствии oligo(dN), комплементарного участку 655–674, метку обнаруживали как в длинном, так и в коротком фрагментах (рис. 3а, дорожка 3). Аналогичную картину наблюдали в случае 18S рРНК, модифицированной аналогами (II) и (III)



**Рис. 3.** Анализ в 5% ПААГ в денатурирующих условиях продуктов гидролиза РНКазой Н 18S рРНК, шивтой с аналогами (I) (а и б) и (II) (в) в тройных комплексах, в присутствии набора oligo(dN), комплементарных определенным последовательностям 18S рРНК (обозначены на схемах гидролиза серыми прямоугольниками) (радиоавтографы). Дорожки 1 – 18S рРНК, шивтая с аналогом мРНК и обработанная РНКазой Н в отсутствие oligo(dN). Схемы гидролиза 18S рРНК представлены слева от каждой панели; стрелками указаны положения фрагментов 18S рРНК, содержащих нуклеотиды, шивтые с аналогом мРНК (черные прямоугольнички). На панелях б и в указаны только фрагменты 18S рРНК, содержащие модифицированные нуклеотиды в пределах последовательности 665–1869. Во всех случаях даны приблизительные длины фрагментов с учетом района 18S рРНК, комплементарного использованному oligo(dN), и без учета длины пришитого олигорибонуклеотида. Номера дорожек на схемах соответствуют номерам дорожек на панелях.



**Рис. 4.** Анализ с помощью электрофореза в 8% ПААГ в денатурирующих условиях продуктов обратной транскрипции модифицированной аналогами (I)–(III) 18S рРНК в присутствии  $[5' \text{-}^{32}\text{P}]$  меченых праймеров, комплементарных последовательностям 1830–1849 (а и б) и 655–674 (в) (радиоавтографы). Дорожки U, G, C и A – продукты секвенирования 18S рРНК, образованные в присутствии ddATP, ddCTP, ddGTP и dTTP соответственно. Дорожки 1, 3 и 5 – продукты удлинения праймера на матрице 18S рРНК, выделенной из бинарных комплексов; дорожки 2, 4 и 6 – продукты удлинения праймера на матрице 18S рРНК, выделенной из трояных комплексов; дорожка К – удлинение праймера на контрольной 18S рРНК. Стрелками указаны остановки обратной транскрипции на основаниях 18S рРНК.

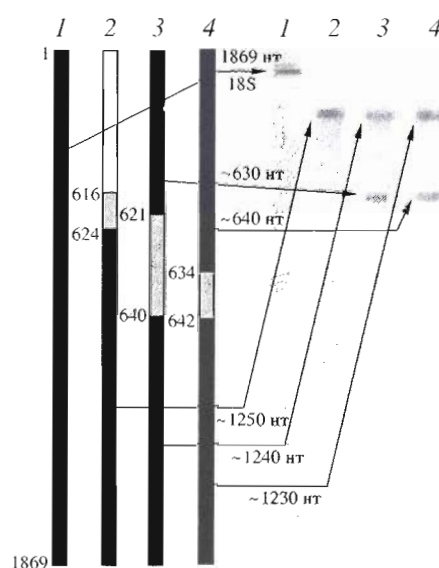
(соответствующие радиоавтографы не приведены). На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что аналоги (I)–(III) сшиваются с 18S рРНК в пределах последовательностей 605–665 и 666–1869. Анализ фрагмента 666–1869 18S рРНК показал, что для всех трех аналогов при расщеплении модифицированной 18S рРНК в присутствии oligo(dN), комплементарного участку 1621–1640, метка остается с 3'-стороны от этого участка, т. е. в 3'-концевом фрагменте длиной около 240 нт (см. рис. 3б и в, дорожки 2, где в качестве примера представлены данные для аналогов (I) и (II), соответственно; аналогичные данные получены для аналога (III)). Обработка 18S рРНК РНКазой H в присутствии двух oligo(dN), один из которых комплементарен району 1621–1640, а другой 1805–1819, в случае аналогов (I) и (III) приводила к образованию двух меченых фрагментов длиной около 180 и 60 нт (см. данные для аналога (I) на рис. 3б, дорожка 3), а в случае аналога (II) – только одного меченого фрагмента длиной 60 нт (рис. 3в, дорожка 3). В то же время после расщепления модифицированной 18S рРНК в присутствии другой пары oligo(dN), комплементарных последовательностям 1621–1640 и 1821–1840, для всех трех аналогов наблюдали один радиоактивный фрагмент длиной около 200 нт (см. рис. 3б и в, дорожки 4, где в качестве примера представлены данные для аналогов (I) и (II) соответственно; аналогичные данные получены для аналога (III)). Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что аналоги (I) и (III) сшиваются с двумя районами 1630–1810 и 1811–1830 3'-концевого мини-домена 18S рРНК, а аналог (II) – только с одним районом 1811–1830.

На основании результатов, полученных с помощью РНКазы H (рис. 3), были выбраны два oligo(dN), комплементарные последовательностям 655–674 и 1830–1849. Эти oligo(dN) использовали в качестве праймеров при определении нуклеотидов 18S рРНК, сшитых с аналогами мРНК, с помощью обратной транскрипции. Модифицированным нуклеотидом, как принято, считали нуклеотид 18S рРНК, расположенный с 5'-стороны от основания, на котором происходит остановка обратной транскрипции. Из рис. 4а видно, что аналоги (I)–(III) сшиваются с нуклеотидами A1823, A1824 и A1825 18S рРНК. Кроме того, в случае аналогов (I) и (III) происходит сшивка с нуклеотидом C1698 18S рРНК (рис. 4б). Модификацию нуклеотидов A1823, A1824 и A1825 18S рРНК рибосом человека неоднократно наблюдали в комплексах, где кодон, содержащий остаток нуклеозида (гуанозина или уридина) со сшивающей группой, находился в А-участке (т.е. нуклеотид, несущий сшивающую группу, был в положении +4, +5 или +6) [9, 12]. Сшивка с нуклеотидом C1698 18S рРНК обнаружена впервые. Модификация 3'-концевого мини-домена 18S рРНК была показана ранее для производного  $r(\text{UUU})_2\text{C}$  с 3'-концевой алкилирующей группой в комплексах, где остаток нуклеозида, несущий эту группу, находился в положении +6/+7 [21]. Однако в этом случае сшивка происходила с нуклеотидом G1702 18S рРНК. Различия в результатах модификации 18S рРНК в комплексах 80S рибосом с фотоактивируемыми аналогами (I)–(III) и алкилирующим производным  $r(\text{UUU})_2\text{C}$  скорее всего связаны с разной природой сшивающих групп. В то же время отсутствие сшивки аналога (II) с нуклеотидом C1698 18S рРНК, с которым сшивались аналоги (I) и (III), может быть

объяснено разной геометрией линкерных группировок, соединяющих фотоактивируемую группу с 3'-фосфатом в аналоге (II) и с атомом C5 остатка уридина или атомом N7 остатка гуанозина в аналогах (I) и (III) соответственно.

Что касается другого района 18S рРНК, а именно 605–665, то с помощью обратной транскрипции нам не удалось определить нуклеотиды, которые сшиваются с аналогами (I)–(III) в этой области (рис. 4в). Детальный анализ района 605–665 18S рРНК с помощью гидролиза модифицированной 18S рРНК РНКазой H в присутствии одного из трех oligo(dN), комплементарных перекрывающимся последовательностям 18S рРНК, позволил сузить этот район до нескольких нуклеотидов. Так, при расщеплении 18S рРНК в присутствии oligo(dN), комплементарного участку 616–624, во всех трех случаях вся метка попадала в длинный фрагмент (рис. 5, дорожка 2), а в случае oligo(dN), комплементарных районам 621–640 и 634–642, – как в длинный (около 1235 нт), так и в короткий (около 635 нт) фрагменты (рис. 5, дорожки 3 и 4). Эти результаты позволяют заключить, что участок модификации 18S рРНК аналогами (I)–(III) находится в пределах последовательности 620–630. Модификацию этого района (а именно G626) 18S рРНК наблюдали ранее в комплексах, где нуклеотид аналога мРНК, несущий сшивающую группу, находился в положении +5 или +6 [9]. Можно предположить, что аналоги (I)–(III) сшивались с этим же нуклеотидом 18S рРНК. Однако полосы, соответствующие остановке обратной транскрипции на нуклеотиде U627, могли слиться на радиоавтографе с интенсивными полосами, отражающими остановки обратной транскрипции на нуклеотидах A628 и U627, которые происходят, вероятно, благодаря частичной деградации 18S рРНК в этом районе (см. рис. 4в, сравни дорожки U, G, C, A и K с дорожками 1–6).

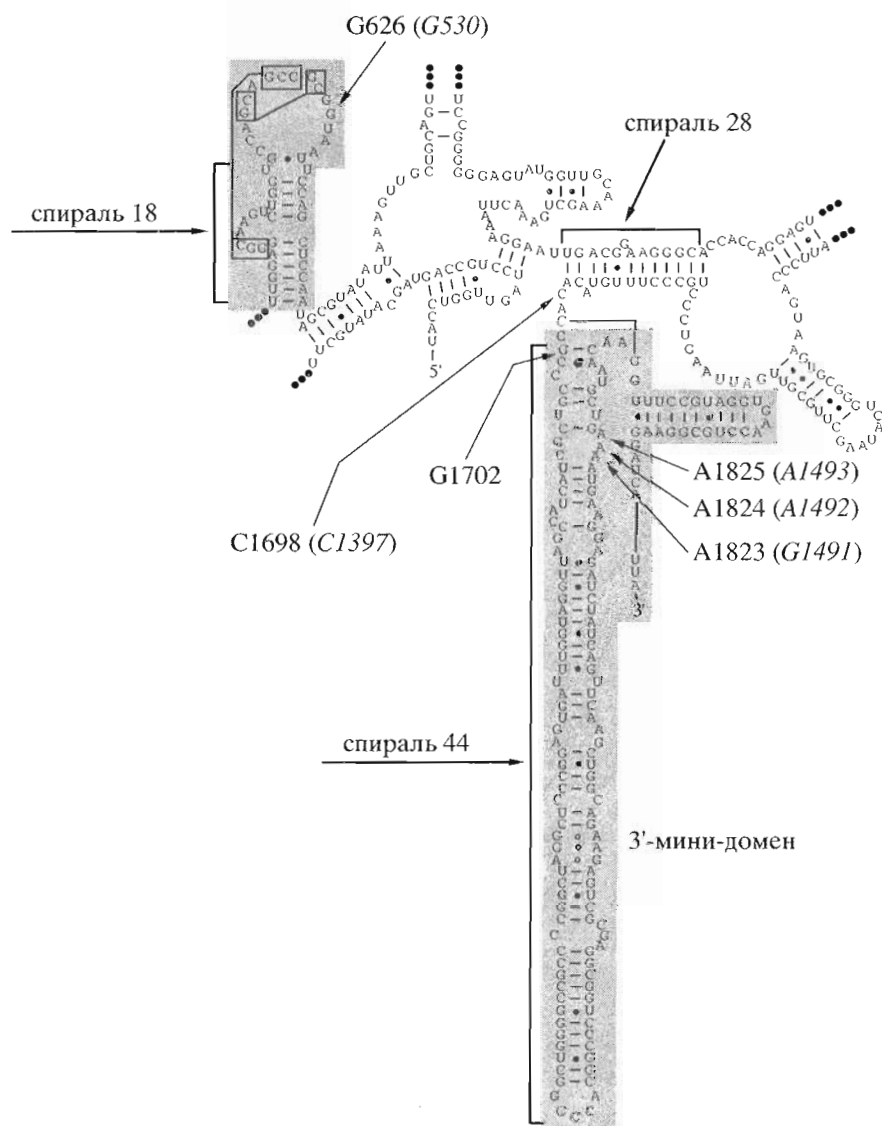
Во вторичной структуре 18S рРНК нуклеотид G626 находится в районе петли, замыкающей спираль 18 5'-домена, нуклеотид C1698 располагается в одноцепочечном районе, соединяющем спираль 44 3'-мини-домена со спиралью 28 3'-домена, а нуклеотиды A1823, A1824 и A1825 принадлежат основанию спирали 44 3'-мини-домена (где также располагается G1702, найденный нами ранее вблизи нуклеотидов мРНК в положении +6/+7 [21]) (рис. 6) [22]. Нуклеотиды C1698, A1824 и A1825 18S рРНК являются инвариантными нуклеотидами во вторичной структуре рРНК малых субчастиц и соответствуют нуклеотидам C1397, A1492 и A1493 16S рРНК *E. coli* [22, 23] (рис. 6). Нуклеотид A1823 18S рРНК является переменным и соответствует нуклеотиду G1491 16S рРНК *E. coli* [22, 23] (рис. 6). Область 620–630 принадлежит высококонсервативной петле, замыкающей спираль 18 рРНК малых рибосомных субчастиц, а предполагаемая мишень модификации G626 18S



**Рис. 5.** Анализ в 5% ПААГ в денатурирующих условиях продуктов гидролиза РНКазой H 18S рРНК, сшитой с аналогом (I) в тройном комплексе, в присутствии набора oligo(dN), комплементарных определенным последовательностям 18S рРНК (радиоавтограф). Дорожка 1 – 18S рРНК, сшитая с аналогом мРНК и обработанная РНКазой H в отсутствие oligo(dN). Схема гидролиза 18S рРНК представлена слева от панели. Стрелками обозначены положения фрагментов 18S рРНК, содержащих нуклеотиды, сшитые с аналогом мРНК (черные прямоугольники). Даны приблизительные длины фрагментов с учетом района 18S рРНК, комплементарного использованному oligo(dN), и без учета длины пришитого олигорибонуклеотида. Номера дорожек на схемах соответствуют номерам дорожек на панелях.

рРНК также является инвариантным нуклеотидом и соответствует G530 16S рРНК *E. coli* [22, 23] (рис. 6).

Интересно сравнить результаты по сшивкам аналогов мРНК (I)–(III) с рибосомами человека с данными РСА рибосом прокариот. Согласно нашим данным, аналог (I), в котором расстояние от сшивающей группы до точки присоединения линкерной группировки к олигорибонуклеотиду составляет около 11 Å, модифицирует те же нуклеотиды 18S рРНК, что и аналог (III), у которого соответствующее расстояние составляет около 14 Å. С этими же нуклеотидами 18S рРНК (за исключением C1698, см. выше) сшивается аналог (II), у которого модифицирующая группа удалена от точки присоединения к олигорибонуклеотиду примерно на 10 Å. Следовательно, можно заключить, что все нуклеотиды 18S рРНК, модифицированные аналогами (I)–(III), располагаются от нуклеотида матрицы в положении +7 на расстоянии не более чем 10 Å. Это хорошо коррелирует с данными РСА бактериальной рибосомы [3, 5], согласно которым нуклеотиды G530, C1397, A1492 и A1493, соответствующие нуклеотидам G626, C1698, A1824 и A1825 18S рРНК, находятся в кристаллической структуре 30S субчастицы в радиусе до 10 Å от



**Рис. 6.** Фрагмент вторичной структуры 18S рРНК [22]. Нуклеотиды 18S рРНК, сшивающиеся с аналогами мРНК, указаны тонкими стрелками; соответствующие им нуклеотиды 16S рРНК *E. coli* отмечены курсивом в скобках. Структурные домены рРНК малой субчастицы рибосомы указаны жирными стрелками. 3'-мини-домен и шпилька, содержащая спираль 18, затемнены.

нуклеотида матрицы в положении +7. Известно, что петля, замыкающая спираль 18, и нуклеотид С1397 16S рРНК участвуют в формировании туннеля, в котором располагается часть матрицы, примыкающая к кодону в А-участке бактериальной рибосомы с 3'-стороны (положения от +7 до +9) [5]. Следовательно, полученные экспериментальные данные подтверждают идею о консервативном коре рибосомы, который образован рРНК и, по-видимому, одинаков в рибосомах всех организмов.

Таким образом, с помощью аналогов мРНК (I)–(III), отличающихся пространственной ориентацией сшивающей группы и длиной линкерных группировок, соединяющих эту группу с олигорибонуклеотидом, получена информация о нуклеотидах 18S рРНК, сближенных с нуклеотидом мат-

рицы в положении +7 на рибосомах человека. Очевидно, эти нуклеотиды играют важную роль в стабилизации на рибосоме нуклеотида мРНК, примыкающего к кодону в А-участке с 3'-стороны. Можно предположить, что инвариантный нуклеотид С1698 18S рРНК принимает непосредственное участие в фиксации нуклеотида матрицы в положении +7 на 80S рибосоме, поскольку известно, что соответствующий ему С1397 16S рРНК [24] ориентирован в направлении нуклеотида мРНК в положении +7 и, по мнению авторов [5], участвует в фиксации этого нуклеотида на 70S рибосоме.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**В работе использовали** тРНК<sup>Phe</sup> (1300 пмоль/ОЕ<sub>260</sub>) *E. coli*, любезно предоставлен-

ную Т.Г. Шапкиной (СПИЯФ РАН, г. Гатчина). Oligo(dN), комплементарные последовательностям 601–611, 616–624, 621–640, 634–642, 655–674, 1621–1640, 1805–1819, 1821–1840 и 1830–1849 18S рРНК человека, синтезировали в лаборатории медицинской химии Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН. [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР (100 Ки/ммоль) синтезирован в лаборатории биотехнологической химии ИХБФМ СО РАН.

**Синтез производного UUUAACUCUCCU**, несущего 2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)аминоэтильную группу на атоме С5 остатка уридина в седьмом положении (см. аналог (I), рис. 1а), его выделение и подтверждение структуры проводили согласно работе [25].

**Синтез производного UUCUAAA**, содержащего 2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)аминоэтильную группу на 3'-концевом фосфате (аналог (II), рис. 1а), его выделение и подтверждение структуры проводили по методике из работы [26].

**Синтез новарибонуклеотида UUCUAAGAA** выполняли по методике из работы [27].

**Фотоактивируемое производное UUCUAAGAA**, несущее 4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоильную группу, присоединенную к атому N7 остатка гуанозина через 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламидный спейсер (аналог (III), рис. 1а), получали согласно работе [28].

**Производные олигорибонуклеотидов метили** по 5'-концу с помощью [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТР и выделяли согласно работе [29].

**40S и 60S рибосомные субчастицы** выделяли по методике из работы [30].

Для получения 80S рибосом субчастицы реактивировали в буфере А, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 120 мМ КСl, 13 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0.65 мМ EDTA, или буфере Б, содержащем 20 мМ НЕРЕС-КОН, рН 7.5, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ EDTA, 0.6 мМ спермидин и 0.8 мМ спермин, при 37°C в течение 10 мин и смешивали в мольном соотношении 40S : 60S = 1 : 1.3. Активность рибосом в poly(U)-зависимом связывании [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> составляла 70% (т. е. 1.4 моль [ $^{14}\text{C}$ ]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> связывалось с 1 моль 80S рибосом).

**Комплексы рибосом с аналогом мРНК** получали, инкубируя 80S рибосомы (конечная концентрация 0.7 мкМ) с 5'- $^{32}\text{P}$ -мечеными аналогами (4 мкМ) и тРНК<sup>Phe</sup> (5 мкМ) в буфере А или Б при 23°C в течение 50 мин. Степень связывания 5'- $^{32}\text{P}$ -меченого аналога с 80S рибосомами определяли с помощью фильтрования комплексов через нитроцеллюлозные фильтры (с диаметром пор 0.45 мкм), предварительно обработанные 0.5 М раствором NaOH в течение 30 мин при 25°C; радиоактивность фильтров, помещенных во флаконы, определяли в воде по Черенкову.

**Облучение комплексов и выделение РНК из облученных комплексов** проводили согласно работе [19].

**Выделенную РНК** анализировали в 1% агарозе в буфере TBE (89 мМ Трис-борат, рН 8.3, 89 мМ борная кислота, 2 мМ EDTA). По окончании электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (10<sup>-6</sup> г/мл), высушивали и радиоавтографировали на рентгеновскую пленку. Фракционирование РНК в 5% ПААГ, содержащем 8 М мочевины, проводили согласно работе [31].

**Участки 18S рРНК, содержащие нуклеотиды, сшитые с аналогом мРНК**, определяли, гидролизуя модифицированную рРНК РНКазой Н в присутствии oligo(dN), комплементарных определенным последовательностям 18S рРНК, и анализируя продукты гидролиза методом электрофореза в 5% ПААГ как описано в работе [32].

**Нуклеотиды 18S рРНК**, с которыми сшивается аналог мРНК, определяли с помощью обратной транскрипции по методике из работы [33]. Реакционные смеси содержали по 1 пмоль 18S рРНК и 5'- $^{32}\text{P}$ -меченого праймера. По окончании реакции образцы обрабатывали и анализировали согласно работе [31].

Работа получила финансовую поддержку гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 02-04-48194 и 02-04-48302), гранта ИНТАС (№ 00-0041) и гранта СО РАН для поддержки молодых ученых (№ 54).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carter A.P., Clemons W.M., Brodersen D.E., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. // Nature. 2000. V. 407. P. 340–348.
2. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A. // Science. 2000. V. 289. P. 920–930.
3. Ogle J.M., Brodersen D.E., Clemons W.M., Tarry M.J., Carter A.P., Ramakrishnan V. // Science. 2001. V. 292. P. 897–902.
4. Yusupov M.M., Yusupova G.Zh., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H.D., Noller H. // Science. 2001. V. 292. P. 883–896.
5. Yusupova G.Zh., Yusupov M.M., Cate J.H.D., Noller H.F. // Cell. 2001. V. 106. P. 233–241.
6. Карпова Г.Г., Кнорре Д.Г. // Успехи биологической химии. 1991. Т. 32. С. 3–49.
7. Сергиев П.В., Лаврик И.Н., Докудовская С.С., Донцова О.А., Богданов А.А. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1129–1143.
8. Грайфер Д.М., Карпова Г.Г., Кнорре Д.Г. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 725–744.
9. Стяжкина В.А., Молотков М.В., Демешкина Н.А., Бульгин К.Н., Грайфер Д.М., Меццининова М.И., Репкова М.Н., Веняминаова А.Г., Карпова Г.Г. // Молекуляр. биология. 2003. Т. 37. С. 1–8.
10. Демешкина Н.А., Лалетина Е.С., Меццининова М.И., Репкова М.Н., Веняминаова А.Г., Грайфер Д.М.,

- Карпова Г.Г. // Молекуляр. биология. 2003. Т. 37. С. 147–155.
11. Demeshkina N., Laletina E., Meschaninova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. V. 1627. P. 39–46.
  12. Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Ven'yaminova A., Karpova G. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 3282–3293.
  13. Молотков М.В., Грайфер Д.М., Мецанинова М.И., Репкова М.Н., Веньяминова А.Г., Карпова Г.Г. // Молекуляр. биология. 2004. Т. 38. С. 493–500.
  14. Грайфер Д.М., Демешкина Н.А., Бульгин К.Н., Репкова М.Н., Веньяминова А.Г., Карпова Г.Г. // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. С. 270–276.
  15. Демешкина Н.А., Репкова М.Н., Веньяминова А.Г., Грайфер Д.М., Карпова Г.Г. // Молекуляр. биология. 2004. Т. 38. С. 501–506.
  16. Watanabe S. // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 67. P. 443–457.
  17. Rodnina M.V., El'skaya A.V., Semenov Yu.P., Kirillov S.V. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 185. P. 563–568.
  18. Bulygin K.N., Graifer D.M., Repkova M.N., Smolenskaya I.A., Veniyaminova A.G., Karpova G.G. // *RNA*. 1997. V. 3. P. 1480–1485.
  19. Demeshkina N., Repkova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. // *RNA*. 2000. V. 6. P. 1727–1736.
  20. Смоленская И.А., Бульгин К.Н., Грайфер Д.М., Иванов А.В., Веньяминова А.Г., Репкова М.Н., Карпова Г.Г. // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. С. 233–241.
  21. Malygin A.A., Graifer D.M., Bulygin K.N., Zenkova M.A., Yamkovoy V.I., Stahl J., Karpova G.G. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 226. P. 715–723.
  22. Gutell R.R. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 3051–3054.
  23. Neefs J.-M., Van de Peer Y., Hendriks L., De Wachter R. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18 (Suppl.). P. 2237–2317.
  24. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons W.M., Jr., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vonnrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V. // *Nature*. 2000. V. 407. P. 327–339.
  25. Репкова М.Н., Иванова Т.М., Комарова Н.И., Мецанинова М.И., Кузнецова М.А., Веньяминова А.Г. // *Биооргани. химия*. 1999. Т. 25. С. 690–701.
  26. Bulygin K.N., Repkova M.N., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G., Frolova L.Yu., Kisselev L.L. // *FEBS Lett.* 2002. V. 514. P. 96–101.
  27. Веньяминова А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // *Биооргани. химия*. 1990. Т. 16. С. 941–950.
  28. Грайфер Д.М., Ляхович А.В., Демешкина Н.А., Иванов А.В., Репкова М.Н., Веньяминова А.Г., Карпова Г.Г. // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. С. 174–182.
  29. Грайфер Д.М., Зенкова М.А., Карпова Г.Г., Мальгин А.А., Матасова Н.Б. // Молекуляр. биология. 1990. Т. 24. С. 1076–1082.
  30. Matasova N.B., Myltseva S.V., Zenkova M.A., Graifer D.M., Vladimirov S.N., Karpova G.G. // *Analyt. Biochem.* 1991. V. 198. P. 219–223.
  31. Graifer D.M., Juzumiene D.I., Wollenzien P., Karpova G.G. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 3878–3884.
  32. Graifer D.M., Malygin A.A., Matasova N.B., Mundus D.A., Zenkova M.A., Karpova G.G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1997. V. 1350. P. 335–344.
  33. Wollenzien P. // *Methods Enzymol.* 1988. V. 164. P. 319–329.

## Template Location on the Human Ribosome: Environment of the mRNA Nucleotide Adjacent to the A-Site Codon on the 3'-Side

N. A. Demeshkina, V. A. Styazhkina, K. N. Bulygin,  
M. N. Repkova, A. G. Ven'yaminova, and G. G. Karpova<sup>#</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (3832) 35-6229; e-mail: karpova@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,  
pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

The 18S rRNA nucleotides close to the 80S ribosome template nucleotide adjacent to the A-site codon on the 3'-end (i.e., the nucleotide in position +7 relative to the first nucleotide of the P-site codon) were identified using template-controlled chemical affinity ligation. For this purpose, used the photoreactive mRNA analogues with a perfluorophenylazido group attached through various linkers to the uridine C5, 3'-terminal phosphate, or guanosine N7 were used. The position of the mRNA analogues on the ribosome was preset using tRNA<sup>Phe</sup>, which recognized the phenylalanine codon directed to the P-site. An analysis of the rRNAs isolated from the irradiated complexes of 80S ribosomes showed that all the analogues are almost equally ligated to the 18S rRNA nucleotides we attributed to the A-site codon environment: namely, to nucleotides A1823, A1824, and A1825 of the 3'-minidomain and to the 620–630 fragment of the 18S rRNA 5'-domain. In addition, we identified a new component of the mRNA binding site of human ribosomes, nucleotide C1698 belonging to the 18S rRNA 3'-minidomain, using analogues bearing a perfluorophenylazido group on uridine and guanine residues. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* eukaryotes, mRNA analogue, photoaffinity ligation, ribosomal RNA, 80S ribosome