



УДК 577.217.34

© 1993 А. А. Малыгин, М. А. Зенкова,
И. А. Смоленская, Г. Г. Карпова

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ 80S РИБОСОМ ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА АНАЛОГАМИ мРНК — ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОУРИДИЛАТОВ С АЛКИЛИРУЮЩЕЙ ГРУППОЙ НА 5'-КОНЦЕ

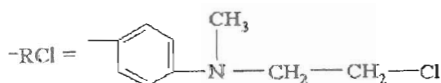
Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Изучена аффинная модификация 80S рибосом из плаценты человека 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензилметилфосфамидами олигоуридилатов pU_n ($n=3, 4, 6, 12$), несущих метку ^{32}P на 5'-конце. В присутствии Phe-tRNA^{Phe} были получены комплексы этих производных с 80S рибосомами, в которых кодон-антикодонное взаимодействие осуществлялось либо в Р-сайте ($n=3, 4$), либо одновременно в Р- и А-сайтах ($n=6, 12$). Все реагенты модифицировали только 40S субчастицу. Относительные степени модификации 18S рРНК составляли 96% для производного pU_3 , 93% для pU_4 , 24% для pU_6 , 4% для pU_{12} . Идентифицированы участки 18S рРНК, в пределах которых происходит ковалентное присоединение аналогов мРНК: участки 976—1061 и 1058—1164 для производного pU_4 и участки 976—1061, 1058—1164, 593—673 и 1748—1869 для pU_{12} . Методом обратной транскрипции определены модифицированные основания 18S рРНК: А-1023, С-1026, А-1027, А-1058, G-1059 для производных pU_3 и pU_4 и А-1058 для производного pU_6 .

К настоящему времени накоплено много экспериментальных данных о контактах различных компонентов трансляции (мРНК, тРНК и т. д.) с рибосомой [1—3]. Однако эти данные во многом противоречивы и не позволяют прийти к какой-либо общепринятой модели расположения лигандов на рибосоме [4, 5]. Кроме того, наиболее интенсивно ведутся работы лишь на 70S рибосомах *E. coli*, в то время как 80S рибосомы эукариот изучены в этом отношении слабо.

Ранее для исследования структурно-функциональной топографии рибосом *E. coli* были успешно использованы алкилирующие производные олигорибонуклеотидов — аналоги мРНК [6]. Недавно нами опубликованы первые работы, где с помощью производных pU_3 и pU_6 , несущих алкилирующую группу на 5'-конце, и pU_3C и pU_6C , несущих алкилирующую группу на 3'-конце, была изучена аффинная модификация 80S рибосом из плаценты человека [7, 8], а

Принятые сокращения: рДНК и рРНК — рибосомные НК; ClRCH₂(CH₂)_npU_n—5'-[4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензилметил]фосфамиды; олигоуридилатов, где



Аффинная модификация 80S рибосом из плаценты человека аналогами мРНК
 $\text{CIRCH}_2(\text{CH}_3)\text{Np}^*\text{U}_n$

Аналог с n	Добавление компонентов		Ковалентно присоединенный реагент, моль на моль субчастиц	
	Phe-тРНК ^{Phe}	pU _n	40S	60S
3	+	—	0,35	0,002
»	—	—	0,01	0,002
»	+	+	0,02	0,002
4	+	—	0,29	0,002
»	—	—	0,01	0,002
»	+	+	0,01	0,002
6	+	—	0,24	0,002
»	—	—	0,02	0,002
»	+	+	0,05	0,002
12	+	—	0,28	0,002
»	—	—	0,02	0,002
»	+	+	0,03	0,002

с помощью производных pAUGU_n ($n=0$ или 3) с алкилирующей группой на 5'-конце [7] и AUGU_nC ($n=0$ или 3) с алкилирующей группой на 3'-конце [9] — аффинная модификация 40S рибосомных субчастиц в составе комплекса инициации трансляции. Во всех случаях были определены районы 18S рРНК, которые подвергались модификации. В настоящей работе с помощью аффинной модификации 80S рибосом из плаценты человека алкилирующими производными pU_3 , pU_4 , pU_6 и pU_{12} изучено распределение модификации между 18S рРНК и белками малой рибосомной субчастицы, установлены районы 18S рРНК, внутри которых происходит модификация производными pU_4 и pU_{12} (участки модификации для производных pU_3 и pU_6 установлены ранее [7]), а для производных pU_3 , pU_4 и pU_6 идентифицированы нуклеотидные остатки 18S рРНК, подвергающиеся модификации.

В предыдущей работе для аффинной модификации 80S рибосом из плаценты человека мы использовали реагенты $\text{CIRCH}_2(\text{CH}_3)\text{Np}^*\text{U}_n$, где p^* — [^{32}P]фосфат ($n=3$ и 6) [7]. Для этих аналогов мРНК было показано, что их связывание зависит от присутствия родственной Phe-тРНК^{Phe}, причем производное pU_3 фиксируется на рибосоме кодон-антикодоновым взаимодействием только в Р-сайте, тогда как производное pU_6 взаимодействует с тРНК как в Р-, так и в А-сайте [10]. В настоящем исследовании в экспериментах по связыванию было показано, что при использовании в качестве аналога матрицы производного pU_4 (как и в случае производного pU_3) фиксация его на рибосоме обеспечивалась одним кодон-антикодоновым взаимодействием в Р-сайте, а фиксация производного pU_{12} (как в случае производного pU_6) — двумя кодон-антикодоновыми взаимодействиями в Р- и А-сайтах (данные не приведены).

Аффинную модификацию 80S рибосом с помощью меченных ^{32}P алкилирующих производных pU_n ($n=4$ и 12) проводили как описано ранее [7]. По окончании реакции комплексы рибосом с реагентами и тРНК разрушали и анализировали распределение метки ^{32}P между субчастицами. В обоих случаях модифицировалась исключительно малая субчастица, причем модификация происходила только в составе специфического комплекса (см. табл. 1). Модифицированные 40S субчастицы диссоциировали на 18S рРНК и белки и анализировали распределение метки ^{32}P между ними. Результаты экспериментов приведены в табл. 2.

Участки 18S рРНК, содержащие мишени для алкилирования аналогами матрицы, установлены методом блот-гибридизации модифицированной и частично гидролизованной 18S рРНК с фрагментами рестрикции 18S рДНК, иммобили-

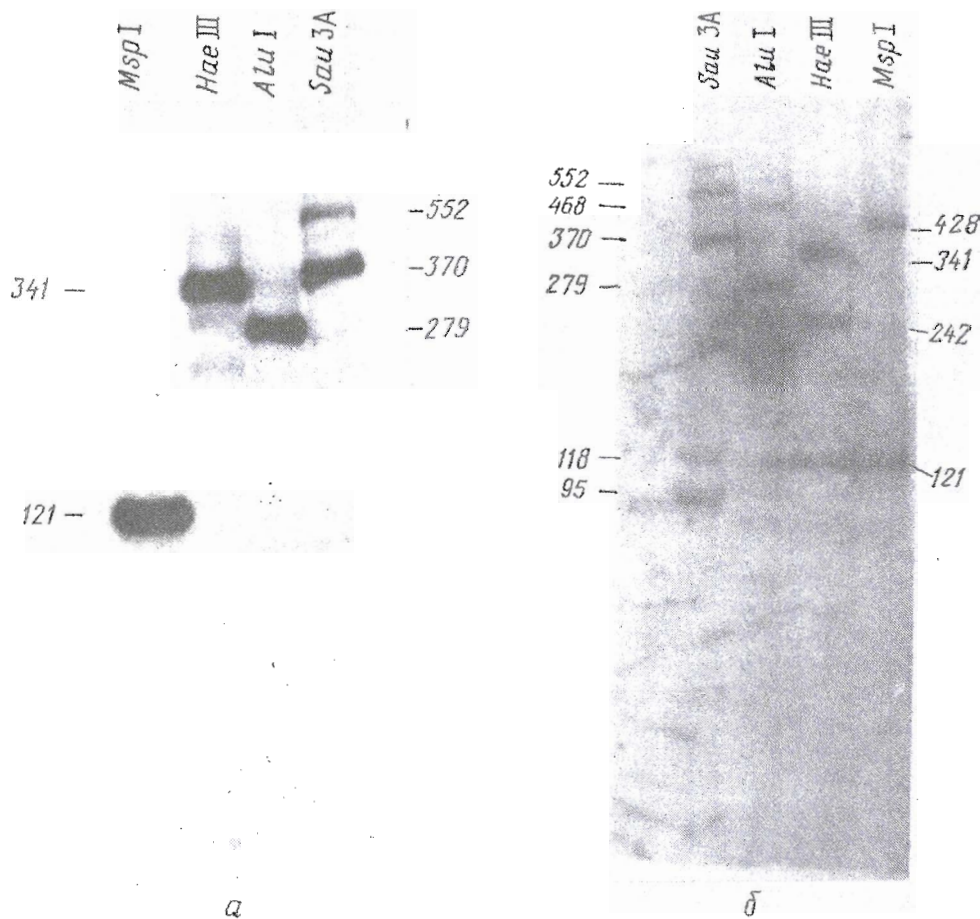


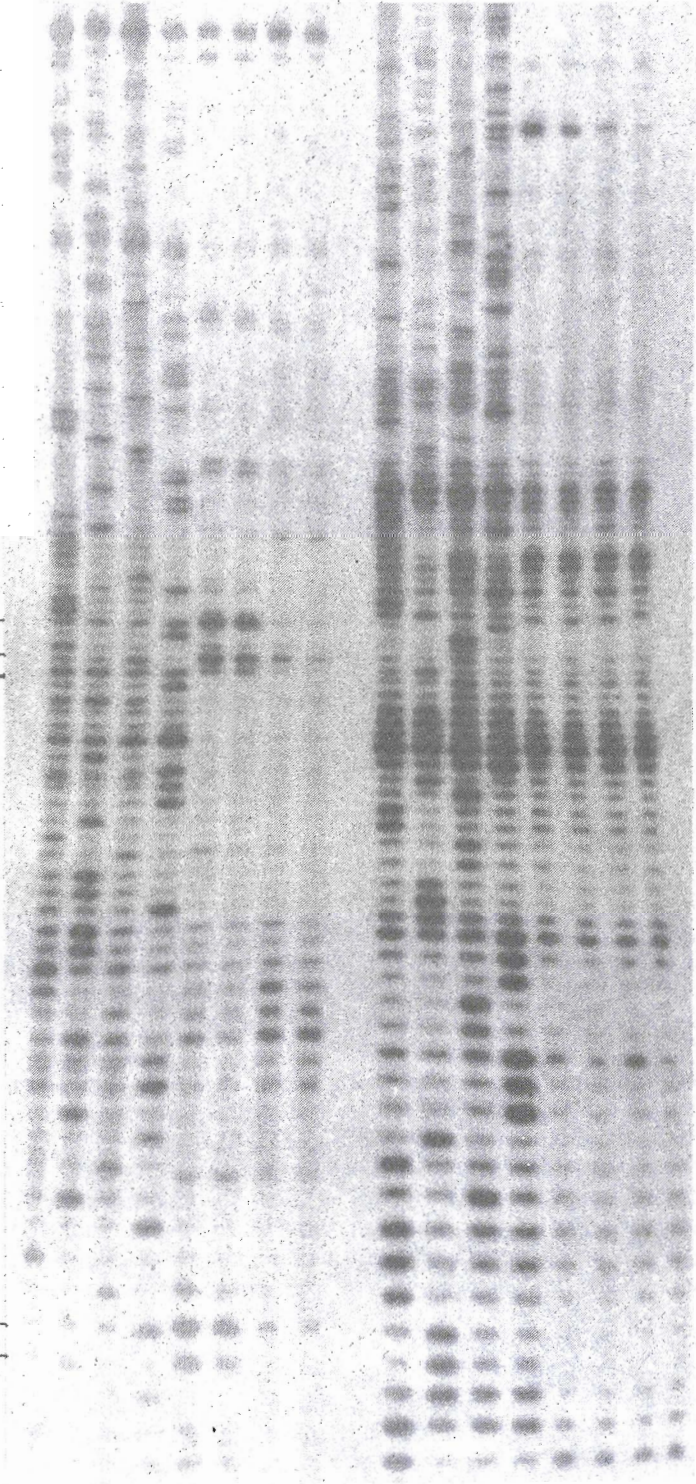
Рис. 1. Блот-гибридизация по Саузерну фрагментов рестрикции рДНК с 18S рРНК, модифицированной $\text{ClRCH}_2(\text{CH}_3)\text{NpU}_4$ (а) и $\text{ClRCH}_2(\text{CH}_3)\text{NpU}_{12}$ (б)

зованными на капроновой мембране. Ранее этим методом нами были установлены участки 18S рРНК, модифицированные алкилирующими производными pU_3 и pU_6 [7]. Результаты экспериментов по блот-гибридизации представлены на рис. 1 и в табл. 3.

Модифицированные основания в 18S рРНК были определены с помощью обратной транскрипции (рис. 2). В качестве праймеров использовали 20-звенные олигонуклеотиды, комплементарные районам 1081—1100 (1) и 1181—1200 (2). В случае производных pU_3 и pU_4 модифицировались А-1023, С-1026, А-1027, А-1058 и G-1059. В случае производного pU_6 из-за низкой степени модификации 18S рРНК (см. табл. 1) с уверенностью можно говорить лишь о модификации А-1058. 18S рРНК, модифицированная производным pU_{12} , для обратной транскрипции не использовалась из-за низкой степени модификации, недостаточной для обнаружения остановок транскрипции.

Использование производных олигоуридилатов разной длины позволило «просканировать» район 80S рибосомы, формирующий окружение 5'-конца матрицы. Из табл. 2 видно, что с увеличением длины олигонуклеотидной части реагента уменьшается доля модифицированной 18S рРНК и увеличивается доля модифицированных белков. Особенно резкий скачок наблюдается при переходе от производного pU_4 к производному pU_6 . Следовательно, связывание второй молекулы тРНК в А-сайте вызывает существенные изменения в окружении 5'-конца мат-

N1 U G C A 3 4 6 K N2 U G C A 3 4 6 K



A-1058
A-1059

A-1023 —
C-1026 —
A-1027 —

A-1058 —
G-1059 —

Таблица 2

Распределение радиоактивной метки между 18S рРНК и рибосомными белками после модификации 80S рибосом аналогами мРНК $\text{CIRCH}_2(\text{CH}_3)\text{NpU}_n$

Аналог с <i>n</i>	Содержание метки ^{32}P , %	
	в рРНК	в белках
3	96	4
4	93	7
6	24	76
12	4	96

Таблица 3

Участки 18S рРНК, подвергающиеся модификации аналогами мРНК $\text{CIRCH}_2(\text{CH}_3)\text{NpU}_n$, и их соответствие участкам 16S рРНК *E. coli*

Аналог, мРНК с <i>n</i> , равным	Участок модификации 18S рРНК	Соответствующий участок 16S рРНК [12]
3 [7]	976—1061*	708—789
	1058—1164	790—885
4	976—1061	708—789
	1058—1164	790—885
6 [7, 8]	976—1061	708—789
	976—1061	708—789
12	976—1061	708—789
	1058—1164	790—885
	593—673	498—575 («530 stem-loop»)
	1748—1869	1446—1542 (3'-end)

* Для участка 976—1057 приводятся уточненные в настоящей работе границы 976—1061.

рицы. Для рибосом *E. coli* имеются данные о существовании излома между двумя соседними кодонами, обеспечивающего одновременное связывание двух молекул тРНК в Р- и А-сайтах [11]. В нашем случае такой излом мог бы реализоваться в комплексах рибосом с производными pU_6 и pU_{12} , фиксированными на рибосоме кодон-антикодонными взаимодействиями одновременно в Р- и А-сайтах. Для производных pU_3 и pU_4 реализуется другой тип комплексов, когда аналог матрицы фиксирован на рибосоме лишь кодон-антикодонным взаимодействием в Р-сайте.

Не исключено также, что полученные данные объясняются функциональной динамичностью структуры самой рибосомы [6]. Так, комплексы $80\text{S} \cdot \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}(\text{P-сайт}) \cdot (\text{pU})_3$ и $80\text{S} \cdot \text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}(\text{P-сайт}) \cdot (\text{pU})_4$ напоминают посттранслокационный комплекс, а комплексы $80\text{S} \cdot \text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{P-сайт}) \cdot (\text{Phe})_2\text{-tRNA}^{\text{Phe}}(\text{A-сайт}) \cdot (\text{pU})_6$ и $80\text{S} \cdot \text{tRNA}^{\text{Phe}}(\text{P-сайт}) \cdot (\text{Phe})_2\text{-tRNA}^{\text{Phe}}(\text{A-сайт}) \cdot (\text{pU})_{12}$ — претрансло-

Рис. 2. Радиоавтограф геля, показывающий определение точек модификации 18S рРНК. Дорожки под № 1 соответствуют кДНК, считанной с праймера 1, дорожки под № 2 — кДНК, считанной с праймера 2. U, G, C, A — дорожки с сигналом 18S рРНК. На дорожках 3, 4, 6 для обратной транскрипции была использована 18S рРНК, модифицированная соответственно производными pU_3 , pU_4 и pU_6 . Отмечены нуклеотиды, на которых происходит остановка обратной транскрипции. К — контроль. В качестве контроля была взята немодифицированная рРНК, выделенная из 80S субчастиц, прошедших все те же стадии инкубации и обработки

кационный комплекс. Как было показано ранее при изучении аффинной модификации рибосом *E. coli* аналогами мРНК, структура декодирующего центра рибосом не является статической, она меняется в процессе трансляции [6]. В зависимости от функционального состояния рибосом те или иные рибосомные компоненты могут попадать в область кодон-антикодоновых взаимодействий и подвергаться аффинной модификации, отражая тем самым динамику функционирования рибосомы в процессе трансляции. Возможно, это одна из причин различий в распределении модификации между рРНК и белками при переходе от комплексов, имитирующих посттранслокационное состояние рибосом (в случае производных rU_3 и rU_4) к претранслокационному комплексу, образованному с помощью производного rU_6 .

Анализ рибосомных белков, подвергающихся модификации аналогами мРНК, — результат отдельного исследования и в настоящей работе не рассматривается.

Участки 18S рРНК, в пределах которых происходила модификация, лежат преимущественно в районах с высококонсервативной структурой [12], что, несомненно, указывает на функциональную важность найденных участков. Благодаря этому также удалось соотнести районы модификации 18S рРНК с соответствующими районами 16S рРНК *E. coli* (табл. 3) [12] и сравнить наши результаты с результатами других исследований.

Район модификации производным rU_4 соответствует району модификации производным rU_3 , установленному ранее [7]. Что касается производного rU_{12} , то в данном случае наблюдается модификация еще в двух районах 18S рРНК: 593—673 и 1748—1869, соответствующих районам «530 stem-loop» и 3'-концевой части в 16S рРНК *E. coli* (см. табл. 3). Ранее модификация этих районов наблюдалась в составе модельных 40S комплексов инициации трансляции при использовании производных AUG U_3 C (район 593—673) и AUGC (район 1748—1869), несущих алкилирующую группу на 3'-конце [9], а также в составе претранслокационных комплексов при использовании аналогичных производных $U_{p_6}C$ и $U_{p_{12}}C$ (район 1748—1869).

По-видимому, при использовании производного rU_{12} в качестве аналога матрицы образуется гетерогенный набор комплексов, имеющих различную длину 5'-концевой олигоуридилатной части реагента, не участвующей в кодон-антикодоновом взаимодействии. В одном из крайних положений в кодон-антикодоновом взаимодействии участвуют два первых триплета, и такой комплекс похож на комплекс, образованный производным rU_6 . Вероятно, именно из таких комплексов происходит модификация 18S рРНК внутри фрагмента 976—1061. В другом крайнем положении в кодон-антикодоновом взаимодействии участвуют два последних триплета, при этом длина свободной олигоуридилатной части реагента позволяет алкилирующей группе реагировать с достаточно удаленными участками 18S рРНК (за счет большого радиуса действия реагента — около 54 Å). По-видимому, из таких комплексов происходит модификация внутри фрагментов 593—673 и 1748—1869, лежащих, по данным [7, 9], вблизи 3'-конца аналогов мРНК, расположенных в декодирующем центре.

Все модифицированные нуклеотидные остатки, найденные с помощью метода обратной транскрипции, находятся в соответствующих районах 18S рРНК, установленным методом блот-гибридизации для каждого реагента. Исключение составляет А-1058, модифицирующийся производным rU_6 (район модификации для этого реагента по гибридизации соответствует фрагменту 976—1057). По-видимому, это несоответствие возникло в результате того, что в экспериментах по блот-гибридизации [7, 8] для удаления «свисающих», неспаренных с фрагментами рДНК нуклеотидных остатков рРНК использовалась рНКаза А, которая не могла удалить «свисающие» пуриновые нуклеотидные остатки. Поэтому гибридизация модифицированной 18S рРНК с фрагментом рестрикции рДНК длиной 370 п. о. из Sau3А-гидролизата в совокупности с остальными данными по блот-гибридизации (см. [7]) должна соответствовать фрагменту 18S рРНК 976—

1061, а не 976—1057, как было указано нами ранее в [7]. В то же время при модификации 18S рРНК производным рU₆ по положению А-1058 должна наблюдаться гибридизация модифицированной 18S рРНК с фрагментом рДНК длиной 552 нуклеотидных остатка из Sau3А-гидролизата, как в случае производных рU₃ и рU₄. Однако относительная интенсивность радиоактивной метки в полосе, соответствующей гибридизации с вышеупомянутым фрагментом рДНК, падает с увеличением длины олигонуклеотидной части реагента и в случае рU₆ практически отсутствует (см. [7, 8]). Складывается впечатление, что массивная модифицирующая группа (несущая гексауридилатный фрагмент), ковалентно связанная с остатком А-1058 18S рРНК, может приводить к нарушению комплементарного спаривания в этом районе и делать его доступным для гидролиза РНКазой А (влияние концевых неспаренных оснований на стабильность гетеродуплекса РНК·ДНК подробно рассмотрено в [13]). В то же время наличие три- и тетрауридилатных остатков, ковалентно связанных с А-1058 или G-1059, влияет на стабильность гетеродуплекса в меньшей степени, чем наличие гексауридилатного остатка.

Можно предположить, что алкилирование А-1058 происходит по положению N1, которое участвует в образовании уотсон-криковской пары. Поэтому при гибридизации 18S рРНК, несущей алкилированный остаток А-1058, с фрагментом рестрикции рДНК длиной 552 п. о. из Sau3А-гидролизата остаток А-1058 не образует комплементарную пару. Структура гетеродуплекса в этом районе нарушается, что делает его доступным для гидролиза РНКазой А. С другой стороны, в остатке гуанина алкилируется атом азота в N7-положении, который не участвует в образовании уотсон-криковской пары. Поэтому при гибридизации 18S рРНК, несущей модифицированный нуклеотидный остаток G-1059, нарушения комплементарного спаривания в этом районе не происходит. Таким образом, при гибридизации 18S рРНК, модифицированной не только по нуклеотидному остатку А-1058, но и по нуклеотидному остатку G-1059 (производным рU₃ или рU₄), радиоактивная метка в полосе «Sau3А-552» наблюдается (см. рис. 1 и [7]), а при гибридизации 18S рРНК, модифицированной только по нуклеотидному остатку А-1058 производным рU₆, радиоактивная метка в этой полосе не регистрируется (см. [7, 8]).

В литературе нет данных о функциональной роли оснований А-1023, С-1026, А-1027, А-1058, G-1059 18S рРНК в рибосомах эукариот. Однако благодаря высокой консервативности этих районов в рРНК малой субчастицы [12] оказалось возможным соотнести найденные основания с соответствующими основаниями в 16S рРНК *E. coli*. Так, А-1058 и G-1059 соответствуют А-790 и G-791 в 16S рРНК. Ранее было обнаружено [14], что эти основания защищаются от химической модификации как тРНК^{Phc}, связанной с 30S субчастицей в присутствии poly (U), так и 50S субчастицей, причем защита происходила, даже если вместо тРНК брали лишь ее фрагмент, образующий антикодоновый стебель.

Основания А-1023, С-1026 и А-1027 соответствуют G-752, С-754 и G-755 в 16S рРНК *E. coli*. Они расположены на стыке спиралей 21 и 22 (нумерация по [12]). Литературные данные об их функциональной роли отсутствуют.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты, плазмиду рTZ18U (Sigma, США), щелочную фосфатазу СРР, АМV-ревертазу (Boehringer Mannheim, ФРГ), эндонуклеазы рестрикции *SaI*, *KpnI*, *Sau3A*, *AluI*, *MspI*, *HaeIII* (НПО «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.), Т4-полинуклеотидкиназу (Fermentas, Литва), капроновую мембрану с диаметром пор 0,2 мкм (экспериментальная лаборатория Хийу Калур, Эстония). Плазида рHr13 была любезно предоставлена проф. Б. Е. Маденом (Великобритания), Phe-тРНК^{Phc} (1500 пмоль/ОЕ₂₆₀) — Д. А. Мундусом (НИБХ, СО РАН), олигоуридилаты рU₃, рU₄, рU₆, рU₁₂ — В. И. Ямковым (НГУ), Cl₂CH₂NHCH₃·2HCl

синтезирован Т. М. Ивановой (НИБХ, СО РАН), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (450 Ки/ммоль) — В. Карамышевым.

Введение метки ^{32}P в олигоуридилаты проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Меченые олигоуридилаты выделяли обращенно-фазовой хроматографией. Синтез $\text{CIRCH}_2(\text{CH})_3\text{N}^+\text{U}_n$ проводили согласно методике, описанной в работе [8]. Степень превращения олигоуридилатов в фосфамидные производные составляла 75—90%. Полученные реагенты выделяли обращенно-фазовой хроматографией. Удельная активность составляла $5 \cdot 10^5$ имп/мин·пмоль по Черенкову на момент их выделения. Комплексы 80S рибосом с реагентами и Phe-тРНК^{Phe} получали как описано в работе [7, 8]. Аффинную модификацию осуществляли согласно [7]. Диссоциацию 80S рибосом и разделение субчастиц проводили в градиенте концентрации сахарозы (10—30%) как описано в [8]. Анализ распределения радиоактивности между рРНК и белками проводили центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (5—20%) в буфере, содержащем додецилсульфат натрия, по методике, описанной в работе [15].

Для определения «остановок» обратной транскрипции на модифицированных нуклеотидных остатках использовали 18S рРНК, полученную фенольной депротенизацией реакционной смеси после окончания алкилирования, с последующим осаждением спиртом. Отжиг праймера проводили в 5 мкл водной смеси, содержащей 2—4 пмоль модифицированной 18S рРНК и 2-кратный избыток меченного ^{32}P праймера (удельная активность 10^5 — 10^6 имп/мин·пмоль по Черенкову), используя последовательные инкубации (2 мин при 90°C, 2 мин при 0°C и 20 мин при 20°C), после чего добавляли 1 мкл буфера $5 \times \text{RTV}$ (250 мМ трис-НСl, рН 8,3, 30 мМ MgCl₂, 200 мМ KCl). Для синтеза цепи кДНК добавляли 2 мкл буфера $5 \times \text{RTV}$, 2 мкл смеси dNTP (2,5 мМ по каждому компоненту), 4 мкл воды и 1 мкл AMV-ревертазы (2 ед. акт.), реакцию проводили 30 мин при 37°C и останавливали, добавляя 15 мкл stop-буфера (1 \times RTV, 0,5% SDS, 1 мМ EDTA). Нуклеотидный материал осаждали этанолом.

Секвенирование 18S рРНК проводили по методу Сэнгера. Отжиг праймера осуществляли как указано выше, но использовали немодифицированную 18S рРНК. Далее, для синтеза цепи кДНК добавляли соответствующее количество буфера $5 \times \text{RTV}$, смеси dNTP и ddNTP, доводили объем реакционной смеси до 14 мкл, добавляли 1 мкл AMV-ревертазы (2 ед. акт.) и инкубировали 30 мин при 37°C. При этом, чтобы получить картину остановок обратной транскрипции по А, конечная концентрация в реакционной смеси dATP, dGTP и dCTP составляла 0,1 мМ, dTTP — 25 и ddTTP — 1,5 мкМ. Для получения остановок обратной транскрипции по С, G и U концентрации dNTP и ddNTP изменялись соответственно.

Электрофорез проводили в 8% денатурирующем ПААГ (1 : 20) при 55° С на приборе Mascrophor (LKB, Швеция) согласно руководству к прибору.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ofengand J., Gornicki P., Chakrabarty K., Nurse K.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 9. P. 2817—2821.
2. 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.
3. Stiege W., Stade K., Schüler D., Brimacombe R.//Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 6. P. 2369—2387.
4. Brimacombe R.//Biochimie. 1992. V. 74. P. 279—284.
5. Lim V., Venclovas C., Spirin A., Brimacombe R., Mitchell Ph., Muller F.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 11. P. 2627—2637.
6. 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.
7. Karpova G. G., Graifer D. M., Malygin A. A., Mundus D. A., Zenkova M. A., Mataev S. V.//Biochimie. 1992. V. 74. P. 373—380.

8. 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.
9. Мундус Д. А., Булыгин К. Н., Веньяминова А. Г., Врацких Л. В., Зенкова М. А., Малыгин А. А., Ренкова М. Н., Ямковой В. И., Карпова Г. Г.//Биоорган. химия. 1993. Т. 19. № 3. С. 299—306.
10. Graifer D. M., Nekhai S. Yu., Mundus D. A., Fedorova O. S., Karpova G. G.//Biochim. et biophys. acta. 1992. V. 1171. № 1. P. 56—64.
11. Fairclough R. H., Cantor C. R.//J. Mol. Biol. 1979. V. 132. P. 587—601.
12. Neefs J. M., Van de Peer Y., Hendriks L., DeWachter R.//Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. Supplement. P. 2237—2242.
13. Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С., Мамаев С. В., Соловьев В. В.//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 788—800.
14. Moazed D., Noller H. F.//Cell. 1986. V. 47. № 6. P. 985—994.
15. Kruse T. A., Siboska G. E., Clark B. C.//Biochimie. 1982. V. 64. № 2. P. 279—284.

Поступила в редакцию
20.I.1993

После доработки
14.IV.1993

*A. A. Malygin, M. A. Zenkova, I. A. Smolenskaya,
G. G. Karpova*

AFFINITY LABELLING OF HUMAN PLACENTA 80S RIBOSOMES WITH mRNA ANALOGUES-DERIVATIVES OF OLIGOURIDYLATES BEARING AN ALKYLATING GROUP AT 5'-END

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

Affinity labelling of 80S ribosomes from human placenta with 4-(N-methylamino-N-2-chloroethyl)benzylmethylphosphoramidate derivatives of oligouridylates pU_n ($n = 3, 4, 6, 12$) bearing 5'- ^{32}P -label was studied. Complexes of these derivatives with 80S ribosomes where codon-anticodon interaction took place either in P-site (in the case of pU_3 - and pU_4 -derivatives), or in P- and A-site simultaneously (in the case of pU_6 - and pU_{12} -derivatives) were obtained in the presence of Phe-tRNA^{Phe}. All the reagents modified only the 40S subunit. The extent of 18S rRNA modification by pU_3 -, pU_4 -, pU_6 - and pU_{12} -derivatives as a fraction of the total modification extent of 18S rRNA and proteins in the 40S subunit equaled 96, 93, 24 and 4%, respectively. The pU_4 -derivative was covalently attached at positions 976—1061 and 1058—1164 and pU_{12} -derivative was covalently attached within regions 976—1061, 1058—1164, 593—673 and 1748—1869 of the 18S rRNA. By means of the primer extension technique, modified bases in 18S rRNA were determined to be: A-1023, C-1026, A-1027, A-1058, G-1059 for pU_3 - and pU_4 -derivatives and A-1058 for pU_6 -derivative.