

3. Кок И. П., Скуратовская И. Н., Строковская Л. И. Молекулярные основы репродукции бакуловирусов.— К.: Наук. думка, 1980.— 173 с.
4. Строковская Л. И. Физическое картирование генома бакуловирусов // Методы молекуляр. биологии.— К.: Наук. думка, 1986.— С. 73—80.
5. Fitch W. M., Smith T. F., Ralph W. M. Mapping the order of DNA restriction fragments // Gene.— 1983.— 22, N 1.— P. 19—29.
6. Labelling DNA to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I // P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg // J. Mol. Biol.— 1977.— 113, N 1.— P. 251—273.
7. Реассоциация ДНК: физические и биологические аспекты / В. И. Прима, В. З. Тарантул, А. В. Шугалий, К. Г. Газарян // Укр. биохим. журн.— 1974.— 46, № 2.— С. 255—269.
8. Вольфсон В. Г., Борхсениус С. Н. Распределение повторяющихся нуклеотидных последовательностей в ДНК макронуклеуса инфузории *Tetrahymena* // Молекуляр. биология.— 1978.— 12, № 4.— С. 894—900.
9. Gelb L. D., Kohne D. E., Martin M. A. Quantitation of simian virus sequences in african green monkey, mouse and virus transformed cell genomes // J. Mol. Biol.— 1971.— 57, N 1.— P. 129—145.
10. Fotis C. K., Weldon C. J., Argiris E. Determination of nucleic acid sequence homologues and relative concentrations by a dot hybridization procedure // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1541—1552.
11. Kraiselburd E., Gage L. R., Weissbach A. Presence of herpes simplex virus DNA fragment in an L-cell clone obtained after infection with irradiated herpes simplex virus 1 // J. Mol. Biol.— 1975.— 97, N 3.— P. 533—542.
12. Smith G. E., Summers M. D. The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzoyloxymethyl-paper // Anal. Biochem.— 1980.— 109, N 1.— P. 123—129.
13. Shoyab M., Dastoor M. N., Baluda M. A. Evidence for tandem integration of avian myeloblastosis virus DNA with endogenous provirus in leukemic chicken cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1976.— 73, N 5.— P. 1749—1753.
14. Мартыненко Е. И. Изучение физико-химических свойств и биосинтеза ДНК вируса ядерного полиэдроса непарного шелкопряда: Автореф. дис. канд. биол. наук.— Киев, 1988.— 20 с.
15. Скуратовская И. Н., Шугалий А. В., Никоненко В. И. Выделение и анализ ДНК из полиэдров при ядерном полиэдрозе большой воцинной моли // Докл. АН УССР. Сер. биология.— 1974.— № 10.— С. 932—934.
16. Genomic localization of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line / M. Zerial, J. Salinas, J. Filipski, G. Gernardi // Nucl. Acids Res.— 1986.— 14, N 21.— P. 8373—8386.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 18.08.89

УДК 577.217.34

© Т. В. Венкстерн, Д. М. Грайфер, Г. Г. Карпова, И. А. Морозов, 1990

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНОГО тРНК<sup>Phe</sup>, НЕСУЩЕГО АРИЛАЗИДОГРУППУ НА ОСТАТКЕ G<sub>24</sub>, С РИБОСОМАМИ ESCHERICHIA COLI И тРНК-(АДЕНИН-1-) МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ THERMUS THERMOPHILUS**

С помощью производного тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli*, несущего арилазидогруппу на остатке G<sub>24</sub>, изучена фотоаффинная модификация рибосом *E. coli* и тРНК-(аденин-1-)метилтрансферазы из *T. thermophilus*. Показано, что производное тРНК при облучении УФ-светом ( $\lambda > 310$  нм) ковалентно присоединяется к тРНК-(аденин-1-)метилтрансферазе, но не присоединяется к рибосомам при локализации как в А-, так и в Р-участке.

**Введение.** Одним из подходов к изучению структурной организации и динамики комплексов тРНК с рибосомами и ферментами является метод аффинной модификации реакционноспособными производными тРНК. Особенно плодотворным оказалось использование фотоактивируемых производных тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli*, содержащих арилазидогруппы, распределенные примерно статистически по остаткам гуанина — (азидо)стат-тРНК<sup>Phe</sup>. Эти производные получали в две стадии: вначале

тРНК<sup>Phe</sup> алкилировали 4-[(N-2-хлорэтил)-N-метиламино] [<sup>14</sup>C] бензил-амином (ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), а затем по остаткам —RCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> вводили арил-азидогруппы обработкой 2, 4-динитро-5-фторфенилазидом [1]. С помощью таких производных проведено систематическое изучение функциональной топографии практически всех известных к настоящему времени типов комплексов тРНК с рибосомами [2—4]. В работе [5] описан метод селективного введения групп —RCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> по атому N7 остатка G<sub>24</sub> тРНК<sup>Phe</sup>. Полученная на основе этого метода (азидо)<sub>24</sub>-тРНК может представлять большой интерес для изучения контактов района G<sub>24</sub> тРНК с рибосомами и ферментами. Положение 24 в элонгаторных тРНК является полуконсервативным: в нем находятся только остатки А или G [6]. Роль этой области в организации различных комплексов с участием тРНК изучена значительно меньше, чем ряда других районов тРНК (например, антикодона или ССА-конца); при этом остаток G<sub>24</sub> тРНК обладает рядом уникальных свойств, например, аномально высокой реакционной способностью по отношению к NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>RCI [7]. Поэтому, как нетрудно рассчитать из данных работы [7], в препарате (азидо)<sub>стат</sub>-тРНК, при получении которого алкилирование тРНК<sup>Phe</sup> ClRCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> проводили в условиях сохранения нативной структуры тРНК, около 30 % включившихся в тРНК остатков реагента приходится на долю G<sub>24</sub>. Кроме того, нуклеотидный остаток в положении 24 прямо влияет на кодирующие свойства тРНК: единственная замена G<sub>24</sub> на A<sub>24</sub> в тРНК<sup>Trp</sup> приводит к тому, что мутантная форма становится супрессорной, т. е., вместо триптофанового кодона узнает нонсенс кодон UGA [8].

В данной работе изучено взаимодействие (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> с А- и Р-участками рибосом *E. coli* и с тРНК-(аденин-1-)-метилтрансферазой из *T. thermophilus*.

**Материалы и методы.** В работе использовали тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli* («Boehringer Mannheim», ФРГ), РНКазу А, РНКазу Т<sub>1</sub> и проназу Р («Serva», ФРГ), Т4-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент», Вильнюс), [<sup>γ</sup>-<sup>32</sup>P]АТР («Радиопрепарат», Ташкент), [<sup>14</sup>C]фенилаланин (11,8 ГБк/ммоль, «UVVVR», ЧССР), поли(U) («Reanal», Венгрия), фактор *EF-Tu* из *E. coli* (НПО «Биолар», Олайне ЛатвССР). тРНК-(аденин-1)-метилтрансферазу выделяли из *T. thermophilus* по [9]. 70S рибосомы *E. coli* с 90 % активностью в поли(U)-зависимом связывании Phe-тРНК<sup>Phe</sup> получали реассоциацией 30S- и 50S-субчастиц, выделенных по [10]. Фенилаланил-тРНК синтетаза (КФ 6.1.1.20) *E. coli* любезно предоставлена В. Н. Анкиловой (Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР). (Азидо)<sub>стат</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> (0,9 моль арилазидогрупп на моль тРНК) получали в условиях сохранения третичной структуры, как описано в [1]. Для получения (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> тРНК<sup>Phe</sup> (5 мкМ), немеченую или меченую <sup>32</sup>P по 5'-концу, алкилировали ClRCH<sub>2</sub>NHpd(AACCA) (200 мкМ), как в [5], с последующим отщеплением олигонуклеотидной части в остатках реагента и выделением модифицированной тРНК по [11]. При этом тРНК<sup>Phe</sup> содержала группу —RCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> только на атоме N-остатка G<sub>24</sub> [5]. Степень модификации составляла 0,6 моль остатков реагента на моль тРНК<sup>Phe</sup>. Затем это производное обрабатывали 2, 4-динитро-5-фторфенилазидом точно так же, как при получении (азидо)<sub>стат</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> по [1]. тРНК<sup>Phe</sup> и препараты азидо-тРНК<sup>Phe</sup> аминциллировали, как описано в [3]. Неэнзиматическое связывание [<sup>14</sup>C] (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> в Р-участке рибосом в присутствии поли(U) проводили инкубацией производного тРНК (4 нмоль) с рибосомами (10 нмоль) и поли(U) (60 ОЕ<sub>260</sub>) в 2,7 мл буфера А (100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5) при 0 °С в течение 1 ч так же, как ранее в случае (азидо)<sub>стат</sub>-тРНК [3]. В аналитическом опыте по определению функциональной активности (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> в неэнзиматическом поли(U)-зависимом связывании в Р-участке рибосом реакционная смесь содержала 40 пмоль [<sup>14</sup>C] (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup>, 120 пмоль рибосом и 1,5 ОЕ<sub>260</sub> поли(U) в буфере А. Для заполнения А-участка Phe-тРНК<sup>Phe</sup> полученный комплекс инкубировали со смесью *EF-Tu*, Phe-тРНК<sup>Phe</sup> и GTP точно так же, как описано в [3]. Связывание [<sup>14</sup>C]Phe-(азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> в А-участке проводили, как описано ранее для Phe-(азидо)<sub>стат</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> [12]. Для этой цели комплекс [<sup>14</sup>C]Phe-(азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> с *EF-Tu* и GTP инкубировали с комплексом рибосома-поли(U)-тРНК<sup>Phe</sup> (в Р-участке). Для ковалентного присоединения азидо-тРНК к рибосомам или метилазе соответствующие комплексы облучали УФ-

светом при  $\lambda > 310$  нм по [3]. Диссоциацию комплексов рибосом на субчастицы осуществляли по методике, описанной в [3].

Связывание (азидо)<sub>стат</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> с метилазой проводили в буфере Б (100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0) инкубацией при 20 °С в течение 5 мин. В экспериментах по изучению специфичности присоединения (<sup>14</sup>C)азидо)<sub>стат</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> к метилазе реакционные смеси содержали в 50 мкл буфера Б 0,12 ОЕ<sub>260</sub> (азидо)<sub>стат</sub>-тРНК<sup>Phe</sup>, 10 мкг метилазы и, если указано, 0,6 ОЕ<sub>260</sub> немодифицированной тРНК<sup>Phe</sup>. Реакционные смеси облучали, затем добавляли трис-HCl до 20 мМ, pH 7,5, ЭДТА до 10 мМ, NaCl до 0,5 М и проводили исчерпывающий гидролиз РНКазой Т<sub>1</sub> (37 °С; 1,5 ч). Продукты анализировали гель-фильтрацией на колонке (объем 2 мл, высота 15 см), заполненной сверху на 1/2 сефадексом G-50 сверхтонким, а снизу — сефадексом G-75 сверхтонким; элюция буфером Б с 0,5 М NaCl при 20 °С. Колонка калибрована тРНК<sup>Phe</sup> и метилазой для определения места выхода высокомолекулярных продуктов и олигонуклеотидом (pA)<sub>5</sub> — для определения места выхода низкомолекулярных продуктов.

Связывание (азидо)<sub>24</sub>-[<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Phe</sup> с метилазой проводили также в буфере Б. Реакционная смесь (0,5 мл) содержала 0,33 ОЕ<sub>260</sub> производного тРНК и 55 мкг метилазы. После облучения смесь концентрировали лиофилизацией до 0,1 мл, что приводило к разрушению комплекса из-за увеличения концентрации NaCl до 0,5 М. Для отделения «сшитых» комплексов от свободной тРНК смесь наносили на колонку с сефадексом G-150 сверхтонким (объем 3,2 мл, высота 20 см), элюцию вели буфером Б, содержащим 0,5 М NaCl. Высокомолекулярную фракцию, содержащую свободную и с присоединенным производным тРНК метилазу, собирали, диализовали против воды, упаривали лиофилизацией до объема 100 мкл. Все эксперименты по доказательству наличия в этой фракции ковалентных шивков метилазы с (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> проводили точно так же, как описано в работе [13].

**Результаты и обсуждение.** (Азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> сохраняла способность к неэнзиматическому поли(U)-зависимому связыванию в Р-участке рибосом. Рибосомы брали в избытке по отношению к тРНК (условия связывания только в Р-участке [14]). В комплекс с рибосомами и поли(U) связывалось не менее 60 % [<sup>14</sup>C] (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup>, взятой в эксперимент. Степень связывания составляла примерно 0,2 моль производного тРНК на моль рибосом (100 %-ному связыванию (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> должно соответствовать значение 0,33 моль производного тРНК на моль рибосом, см. «Материалы и методы»). В отсутствие матрицы уровень связывания (азидо)<sub>24</sub>-тРНК снижался в 5 раз; в присутствии поли(U) и 10-кратного избытка немодифицированной тРНК<sup>Phe</sup> по отношению к рибосомам связывание (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> вообще не регистрировалось. Оба теста свидетельствуют о том, что (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> связывается с рибосомами в Р-участке кодон-специфично, так же как и немодифицированная тРНК.

Ковалентное присоединение производного тРНК к рибосомам в Р-участке изучали при А-участке, свободном или занятом Phe-тРНК<sup>Phe</sup>. Условия эксперимента были полностью идентичными таковым в проведенных ранее экспериментах по фотоаффинной модификации Р-участка рибосом с помощью (азидо)<sub>стат</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> [3]. После облучения УФ-светом ( $\lambda > 310$  нм) соответствующие комплексы центрифугировали в градиенте концентрации сахарозы в условиях диссоциации на субчастицы (0,5 мМ Mg<sup>2+</sup>). Однако сколько-нибудь заметной радиоактивности в субчастицах обнаружено не было (в эксперимент брали 4 пмоль или 50 000 имп/мин [<sup>14</sup>C] (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup>).

Модификацию А-участка изучали в составе комплекса [<sup>14</sup>C]Phe-(азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> (в А-участке)·рибосома·поли(U)·тРНК<sup>Phe</sup> (в Р-участке) \*. Производное тРНК в А-участке локализовали с помощью фактора EF-Tu и GTP; рибосомы брали в трехкратном избытке по отношению к аминоктил-тРНК для того, чтобы содержащаяся в препарате Phe-(азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> немодифицированная Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (40 %) не ингибировала связывания производного тРНК в А-участке. Р-участок рибосом был предварительно блокирован деацилированной тРНК<sup>Phe</sup>.

\* Удельная радиоактивность [<sup>14</sup>C]фенилаланина более чем на порядок превышает таковую у группировки, присоединенной к G<sub>24</sub>.

Около 80 % взятой в эксперимент  $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ - (азидо) $_{24}$ -тРНК в выбранных условиях находились в составе комплекса с рибосомами, по данным фильтрации на нитроцеллюлозных фильтрах (в эту величину входит и связывание присутствующей в препарате немодифицированной  $[^{14}\text{C}]\text{Phe}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$ ). После облучения комплексов рибосомы анализировали центрифугированием в условиях диссоциации на субчастицы. Ковалентного присоединения производного тРНК к рибосомам заметить в этом случае также не удалось (общее количество радиоактивности, взятое в эксперимент, составляло 45 000 имп/мин).

Таким образом, (азидо) $_{24}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  не способна ковалентно присоединиться к рибосомам ни в Р-, ни в А-участке в отличие от производных тРНК $^{\text{Phe}}$  с точно такими же арилазидогруппами, но распределенными статистически по многим остаткам гуанина. Это связано, очевидно, с тем, что арилазидогруппа на остатке  $G_{24}$  не контактирует с рибосомой в соответствующих комплексах. Поскольку спейсерная группировка реагента достаточно длинная ( $\sim 1,25$  нм) и имеет свободу вращения, наиболее разумно сделать вывод о том, что район  $G_{24}$  тРНК $^{\text{Phe}}$  «выпячивается» из рибосомы при локализации тРНК как в А-, так и в Р-участках. Такой вывод хорошо согласуется с данными о том, что при связывании тРНК $^{\text{Phe}}$  в А-участке рибосом остаток  $G_{24}$  не защищается рибосомой от химической модификации [15, 16]; при связывании же в Р-участке остаток  $G_{24}$  тРНК $^{\text{Phe}}$  не только не экранируется рибосомой от химической модификации, но напротив, резко увеличивает свою реакционную способность по отношению к диметилсульфату [17]. Итак, район  $G_{24}$  в тРНК $^{\text{Phe}}$  не вовлекается непосредственно во взаимодействие с рибосомой; возможно, он прямо участвует в организации комплексов тРНК с некоторыми ферментами.

В данной работе изучено взаимодействие (азидо) $_{24}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  с тРНК-(аденин-1)-метилтрансферазой (метилазой) из *T. thermophilus*. Этот фермент, состоящий из переменного количества одинаковых субъединиц с молекулярной массой около 25 000, катализирует перенос метильной группы с S-аденозил-L-метионина в положение 1 остатка  $A_{58}$  в Т-петле различных тРНК [9, 18]. Аффинную модификацию метилазы с помощью азидо-тРНК проводили при УФ-облучении комплексов тРНК с ферментом, полученных в отсутствие S-аденозил-L-метионина. Для доказательства специфичности фотосшивки азидо-тРНК с метилазой (т. е. ковалентного присоединения именно в составе комплекса производного тРНК с ферментом) использовали ( $[^{14}\text{C}]\text{азидо}$ ) $_{\text{стат}}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$ , содержащую 0,9 моль модифицирующих групп на моль тРНК $^{\text{Phe}}$ . В этом препарате, как упоминалось выше, около 30 % модификации приходится на остаток  $G_{24}$ . Функциональную активность (азидо) $_{\text{стат}}$ - и (азидо) $_{24}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  по отношению к метилазе определяли в условиях исчерпывающего метилирования тРНК с использованием S-аденозил-L- $[^{14}\text{C}]\text{метионина}$ , как описано в [18]. Включение  $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3$ -групп в (азидо) $_{\text{стат}}$ - или (азидо) $_{24}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  составляло 0,8—0,9 моль на моль тРНК, что практически совпадало со значением, полученным для исходной тРНК $^{\text{Phe}}$  (0,9 моль  $\text{CH}_3$ -групп на моль тРНК).

Комплексы ( $[^{14}\text{C}]\text{азидо}$ ) $_{\text{стат}}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  с метилазой облучали, затем добавляли NaCl до концентрации 0,5 М для полного разрушения комплекса и проводили исчерпывающий гидролиз РНКазой  $T_1$ . Продукты анализировали гель-фильтрацией. Более 10 % радиоактивной метки ( $\sim 700$  имп/мин) выходило в высокомолекулярной фракции, т. е. во фракции  $[^{14}\text{C}]\text{азидо}$ олигонуклеотидов, ковалентно присоединенных к метилазе, остальное количество радиоактивности (около 5 000 имп/мин) выходило в низкомолекулярной фракции. Ковалентное присоединение (азидо) $_{\text{стат}}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  к метилазе ингибируется 5-кратным избытком немодифицированной тРНК $^{\text{Phe}}$  по отношению к (азидо) $_{\text{стат}}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$ , что свидетельствует о присоединении производного тРНК к метилазе в составе специфичного комплекса. Количество активности в высокомолекулярной фракции уменьшалось при этом до 300 имп/мин.

Для изучения аффинной модификации метилазы (азидо) $_{24}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  на 5'-конец производного тРНК вводили метку  $^{32}\text{P}$ . При получении

комплекса метилазу брали в 4-кратном избытке в пересчете на субъединицы, что соответствовало молярному соотношению фермент : тРНК порядка 1 : 1 [19]. В этих условиях большая часть тРНК находится в комплексе с ферментом [19]. После облучения производное тРНК, не связавшееся ковалентно с ферментом, отделяли от фермента гель-фильтрацией на сефадексе G-150 в условиях полной диссоциации комплекса (рис. 1). На профиле гель-фильтрации наблюдаются три пика, все они содержат метку  $^{32}\text{P}$ . Первый пик (высокомолекулярная фракция) с  $A_{280}/A_{260} > 1$ , очевидно, соответствует материалу преимущественно белковой природы, а именно, «сшитым» комплексам метилазы с тРНК; второй пик  $A_{280}/A_{260} \approx 0,6$  содержит большую часть (73 %) метки, его следует отнести к (азидо) $_{24}$ - $^{32}\text{P}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$ , не присоединившейся ковалентно к метилазе. Третий пик — низкомолекулярная фракция, ве-

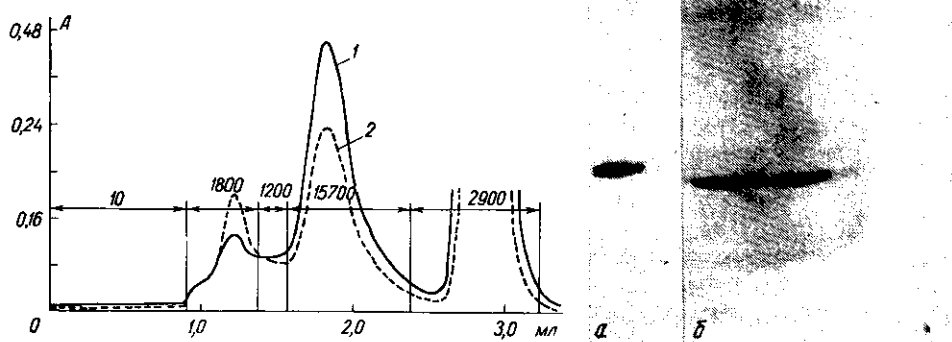


Рис. 1. Профиль гель-фильтрации облученного комплекса (азидо) $_{24}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  с метилазой на сефадексе G-150 в условиях полной диссоциации комплекса: 1, 2 — поглощение при 260 и 280 нм соответственно. Цифрами указана радиоактивность во фракциях по Черенкову в имп/мин

Fig. 1. Gel-filtration of irradiated complex of (azido) $_{24}$ - $^{32}\text{P}$ -tRNA $^{\text{Phe}}$  with methylase on Sephadex G-150 under conditions of complete complex dissociation: 1, 2 — absorption at 260 and 280 nm, respectively. Radioactivities of the fractions are indicated by Cherenkov radiation, cpm

Рис. 2. Электрофорез в 12 %-ном ПААГ, содержащем DS-Na, облученного комплекса (азидо) $_{24}$ - $^{32}\text{P}$ -тРНК $^{\text{Phe}}$  с метилазой после обработки его РНКазой А и мечения продуктов  $^{32}\text{P}$  с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (1) и препарата метилазы (2): а — автораддиограмма геля; б — фотография геля после окрашивания белка с помощью ку-масси R-250

Fig. 2. Electrophoresis in 12 % polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate of irradiated complex (azido) $_{24}$ - $^{32}\text{P}$ -tRNA $^{\text{Phe}}$  methylase after its treatment with RNase A with subsequent labelling of the products with  $^{32}\text{P}$  by polynucleotide kinase (1); of the methylase preparation (2): a — autoradiogram of the gel; б — photography of the gel after its staining with Coomassie R-250

роятно, продукты деградации тРНК, меркаптоэтанол и т. п. Из данных гель-фильтрации видно, что в условиях полной диссоциации комплекса 8—10 % метки  $^{32}\text{P}$  после облучения остается в высокомолекулярной фракции. Материал из первого пика после соответствующих процедур (см. «Материалы и методы») подвергали исчерпывающему гидролизу РНКазой А и в образующиеся олигонуклеотиды вводили метку с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и Т4-полинуклеотидкиназы. Полученные продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии DS-Na — в условиях диссоциации метилазы на субъединицы (рис. 2). На автораддиограмме видна единственная полоса, расположенная чуть выше полосы субъединицы метилазы. Очевидно, полоса, содержащая метку  $^{32}\text{P}$ , соответствует субъединице метилазы с присоединенным ковалентно меченым олигонуклеотидом, оставшимся после гидролиза тРНК. Количество белкового материала в этой

полосе слишком мало, чтобы обнаружить его по окрашиванию. Поэтому для доказательства присутствия белка в этой полосе материал элюировали из геля, освобождали от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на сефадексе G-10, подвергали обработке проназой Р и полученные продукты анализировали электрофорезом в ПААГ, содержащем 8 М мочевины. При этом обработка проназой Р вызывала значительную фрагментацию материала, содержащего метку, что свидетельствует о наличии в нем белка.

Таким образом, (азидо)<sub>24</sub>-тРНК<sup>Phe</sup> способна присоединяться к метилазе в составе специфического комплекса, т. е., вероятно, что район G<sub>24</sub> в тРНК<sup>Phe</sup> контактирует с метилазой. В литературе имеются данные о том, что остаток G<sub>24</sub> тРНК<sup>Phe</sup>, возможно, контактирует с фенилаланил-тРНК синтетазой в составе соответствующего комплекса, поскольку синтетаза защищает G<sub>24</sub> от модификации алкилирующими реагентами [7]. Следовательно, можно предположить, что остаток G<sub>24</sub> важен для формирования комплексов тРНК только с ферментами: аминокил-тРНК синтетазами, ферментами, модифицирующими тРНК, и пр. Следует отметить, что район 4-тиоуридина (s<sup>4</sup>U<sub>8</sub>) в положении 8 также контактирует с метилазой [13]. В третичной структуре тРНК<sup>Phe</sup> оба района — G<sub>24</sub> и s<sup>4</sup>U<sub>8</sub> — сближены и находятся в центральной части L-образной молекулы тРНК между углом L и антикодоном. По-видимому, вся эта часть тРНК участвует в формировании комплекса с метилазой, в то время как каталитический центр фермента окружает «угол» молекулы тРНК — остаток A<sub>58</sub> в Т-петле.

#### STUDIES IN THE INTERACTION OF THE tRNA<sup>Phe</sup> DERIVATIVE BEARING AN ARYL-AZIDE GROUP ON ITS G<sub>24</sub> RESIDUE WITH *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES AND tRNA-(ADENINE-1-)METHYL TRANSFERASE FROM *THERMUS THERMOPHILUS*

T. V. Venkstern\*, D. M. Graifer, G. G. Karpova, I. A. Morozov\*

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch  
of the USSR Academy of Sciences, Novosibirsk  
\*Enhelhardt Institute of Molecular Biology,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

#### Summary

Photoaffinity labelling of *E. coli* ribosomes and tRNA (adenine-1-)methyl transferase has been studied using *E. coli* tRNA<sup>Phe</sup> derivative bearing an aryl-azide group on its G<sub>24</sub> residue. Under UV-irradiation ( $\lambda > 310$  nm) this derivative is shown to be cross-linked to tRNA(adenine-1-)methyl transferase from *T. thermophilus* but being located at ribosomal A or P site no cross-linking of the tRNA derivative to the ribosomes is observed.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Модификация фенилаланил-тРНК-синтетазы *E. coli* производным тРНК<sup>Phe</sup>, несущим реакционноспособные группы на остатках гуанозина / В. В. Власов, О. И. Лаврик, С. В. Мамаев и др. // Молекуляр. биология. — 1980. — 14, № 3. — С. 531—538.
2. Vladimirov S. N., Graifer D. M., Karpova G. G. The proteins of donor tRNA binding site of *Escherichia coli* ribosomes // FEBS Lett. — 1981. — 135, N 1. — P. 155—158.
3. Structural arrangement of tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes as revealed from data on affinity labelling with photoactivable tRNA derivatives / D. M. Graifer, G. T. Babkina, N. B. Matasova et al. // Biochim. et biophys. acta. — 1989. — 1008, N 1. — P. 146—156.
4. Фотоаффинная модификация Е-сайта рибосом *E. coli* / С. Н. Владимиров, Д. М. Грайфер, М. А. Зенкова и др. // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 1. — С. 45—50.
5. Селективное алкилирование тРНК<sup>Phe</sup> по остатку G<sub>24</sub> / О. И. Гимаутдинова, И. И. Горшкова, Д. М. Грайфер и др. // Молекуляр. биология. — 1984. — 18, № 5. — С. 1419—1423.
6. Sprinzl M., Gruter F., Hauss D. H. Collection of published tRNA sequences // Nucl. Acids Res. — 1978. — 5, N 5. — P. r15—r28.
7. Алкилирование тРНК<sup>Phe</sup> и комплекса тРНК<sup>Phe</sup> с фенилаланил-тРНК-синтетазой *Escherichia coli* с помощью 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина // Молекуляр. биология. — 1981. — 15, № 1. — С. 45—53.

8. Buckingham R. H., Kurland C. G. Interaction between UGA-suppressor tRNA<sup>Trp</sup> and the ribosome; mechanisms of tRNA selection // Transfer RNA: Biol. Aspects.— New York: Cold Spring Harbor, 1980.— P. 421—426.
9. Морозов И. А., Гамбарян А. С., Венкстерн Т. В. тРНК(аденин-1)-метилтрансфераза из *Thermus thermophilus* // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1363—1368.
10. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P. Mechanism of codon-anticodon interaction in ribosomes. Direct functional evidence that isolated 30S subunits contain 2 codon-specific binding sites for tRNA // Nucl. Acids Res.— 1980.— 8, N 1.— P. 183—196.
11. Алкилирование тРНК<sup>Phe</sup> 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил-5'-фосфамидом d(ATTTTCA) / О. И. Гимаутдинова, В. В. Горн, И. И. Горшкова и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 4.— С. 490—498.
12. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Матасова Н. Б. Аффинная модификация рибосом *Escherichia coli* вблизи акцепторного тРНК-связывающего участка // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 5.— С. 1287—1296.
13. Взаимодействие района s<sup>4</sup>U<sub>8</sub> тРНК<sup>Phe</sup> с тРНК(аденин-1)-метилтрансферазой из *Thermus thermophilus* / Т. В. Венкстерн, Д. М. Грайфер, Э. А. Грачева и др. // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 10.— С. 1344—1350.
14. Mechanism of codon-anticodon interactions in ribosomes. Codon-anticodon interaction of aminoacyl-tRNA at the ribosomal donor site / S. V. Kirillov, K. Sh. Kemkhadze, E. M. Makarov et al. // FEBS Lett.— 1980.— 120, N 2.— P. 221—224.
15. Douthwaite S., Garrett R. A., Wagner R. Comparison of *Escherichia coli* tRNA<sup>Phe</sup> in the free state, in the ternary complex and in the ribosomal A and P sites by chemical probing // Eur. J. Biochem.— 1983.— 131, N 2.— P. 261—269.
16. Bertram S., Goring U., Wagner R. Structural investigation of Phe-tRNA<sup>Phe</sup> from *Escherichia coli* bound to the ribosomal A site // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 3.— P. 575—585.
17. Peattie D. A., Herr W. Chemical probing of the tRNA-ribosome complex // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1981.— 78, N 4.— P. 2273—2277.
18. Purification and characterization of tRNA(Adenine-1)-methyltransferase from *Thermus thermophilus* strain 71 / I. A. Morozov, A. S. Gambaryan, T. N. Lvova et al. // Eur. J. Biochem.— 1982.— 129, N 2.— P. 429—439.
19. Использование флуоресценции триптофановых остатков тРНК(аденин-1)-метилтрансферазы для исследования структуры фермента и его комплексов с тРНК / О. Ф. Борисова, И. А. Морозов, Н. В. Кузнецова и др. // Молекуляр. биология.— 1986.— 20, № 4.— С. 1126—1137.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск  
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 28.08.89

УДК 577.963.3

© М. М. Юсупов, Т. Н. Спирина, 1990

## ДОСТУПНОСТЬ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ТРИПСИНУ В РИБОСОМАХ THERMUS THERMOPHILUS

Определены белки, доступные трипсину, в составе рибосом и рибосомных субчастиц из экстремального термофила *T. thermophilus*. В 70S рибосомах доступны трипсину 7 белков малой (30S) субчастицы — TS2, TS3, TS7, TS12, TS17, TS19, TS20 и 5 белков большой (50S) субчастицы — TL5, TL8, TL9, TL23, TL24. Диссоциация 70S рибосом на субчастицы не приводит к появлению дополнительных белков, доступных трипсину. Последнее подтверждает сделанный ранее вывод об отсутствии рибосомных белков между субчастицами.

**Введение.** Метод трипсинолиза был разработан для определения белков, экспонированных на поверхности рибосом *Escherichia coli*, и исследования изменений поверхности рибосом в процессе их функционирования [1]. Было показано, что трипсин обладает высокой чувствительностью к изменениям в структуре рибосом и в то же время не разрушает рибосому, модифицируя лишь часть белков, расположенных на поверхности.

Этот метод также был использован для сравнения доступности трипсину рибосомных белков в рибосомах и диссоциированных субчастицах. Белки, более доступные трипсину в диссоциированных рибосомных субчастицах, были отнесены к белкам, расположенным на контактирующих поверхностях субчастиц [2]. Однако диссоциация рибосомы