

14. Lawrence G. J., Appels R. Mapping the nucleolus organizer region, seed protein loci and isozyme loci on chromosome 1R in rye // Theor. and Appl. Genet.—1986.—71, N 5.— P. 742—749.

Отдел биохимии  
и цитохимии Башкир. фил. АН СССР, Уфа

Получено 23.05.88

#### NUCLEOTIDE SEQUENCE OF LARGE 5S DNA REPEAT IN DIPLOID WHEAT TRITICUM MONOCOCCUM L.

V. A. Vakhitov, Yu. M. Nikonov

Department of Biochemistry and Cytochemistry,  
Bashkir Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Ufa

#### Summary

Nucleotide sequence of large 5S DNA repeated unit 485 base pairs long, was determined in diploid wheat *Triticum monococcum*. The differences in length in two families of 5S DNS repeats in this wheat species are shown to be related to 154 b. p. deletion in central region of intergenic spacer. A high homology of 5S rRNA coding regions, terminating sequences, 3'-ends in intergenic spacers in both families of 5S DNA repeats and also in repeats of similar length in two samples of *T. monococcum* is shown. Contrary to dicotyledon plants ATATATATTA sequence in cereal species under investigation is found to be located nearer to 5'-end of the intergenic spacer.

УДК 577.217;577.18.02

К. А. Солдаткин, О. В. Ковальчук, А. П. Иотапов, А. В. Ельская,  
Н. Ф. Крынецкая, Н. Г. Долинная, З. А. Шабарова

#### ДЕЗОКСИРИБОАНАЛОГ АНТИКОДОНОВОЙ ВЕТВИ ДРОЖЖЕВОЙ тРНК<sup>Pro</sup> НЕ СПОСОБЕН К КОДОН-ЗАВИСИМОМУ СВЯЗЫВАНИЮ С МАЛЫМИ СУБЧАСТИЦАМИ РИБОСОМ ESCHERICHIA COLI И ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

Для изучения влияния модификаций сахарофосфатного остова антикодонной области тРНК на ее взаимодействие с рибосомами использован олигонуклеотид d(CCAGACTGAAGATCTGG), соответствующий по нуклеотидной последовательности немодифицированной антикодонной ветви дрожжевой тРНК<sup>Pro</sup>. Показано, что данный олигонуклеотид в растворе образует внутримолекулярную «шпильку», однако не способен связываться с 30S и 40S субчастицами рибосом *E. coli* и печени кролика соответственно в присутствии рибо-(поли(U)) и дезоксирибо-(поли(dT)) матриц. Добавление антибиотика неомицина В не меняло ситуации.

**Введение.** Для объяснения механизма отбора аминоксил-тРНК на рибосомах и транслокации предложена гипотеза стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов, постулирующая прямое взаимодействие декодирующего центра рибосом с сахарофосфатным остовом кодон-антикодонных дуплексов [1—4]. Согласно гипотезе, модификации сахарофосфатного остова кодона или антикодона должны оказывать существенное влияние на взаимодействие тРНК с программированной рибосомой. Природным вариантом полинуклеотида с «модифицированным» рибозофосфатным остовом является ДНК. В норме однотяжевая ДНК не может быть транслирована в бесклеточной белоксинтезирующей системе из *E. coli*, но в присутствии некоторых аминокликозидных антибиотиков, в первую очередь неомицина В, такая трансляция становится возможной [5—7].

В этой связи большой интерес представляет изучение влияния модификаций сахарофосфатного остова антикодонной области тРНК на

ее взаимодействие с рибосомами. В качестве модели тРНК мы использовали ее антикодонную ветвь. Этот подход был предложен в 1969 г. Дьюбом [18]. Оказалось, что параметры связывания антикодонной ветви дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> с поли(U)-программированными 30S субчастицами рибосом из *E. coli* близки к параметрам целой тРНК [9, 10]. Было показано, что синтетический олигонуклеотид г(GGCCAAAAAAGGCC), не имеющий в своем составе модифицированных нуклеотидов, также способен связываться с поли(U)-программированными рибосомами [11].

В данной работе изучена возможность связывания дезоксирибонуклеотидов (в дальнейшем d(N)<sub>17</sub>) — аналога антикодонной ветви тРНК<sup>Phe</sup> из дрожжей — с 30S и 40S субчастицами рибосом, программированными поли(U) или поли(dT), в присутствии и отсутствии неомидина В.

**Материалы и методы.** 30S субчастицы рибосом *E. coli* MRE 600 любезно предоставлены В. И. Махно (ЛИЯФ им. Б. П. Константинова АН СССР, Гатчина). 40S субчастицы из печени кролика получены по [12]. Т4-полинуклеотидкиназа — НПО «Фермент» Вильнюс. Поли(U) фирмы «Reanal» (ВНР), поли(dT) производства НИКТИ БАН (Бердск), неомидин сульфат фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ), [<sup>14</sup>C]фенилаланин (13,3 ГБк/ммоль) производства СССР, [<sup>32</sup>P]АТФ (37 ТБк/ммоль) — «Радиопрепарат» АН УзССР.

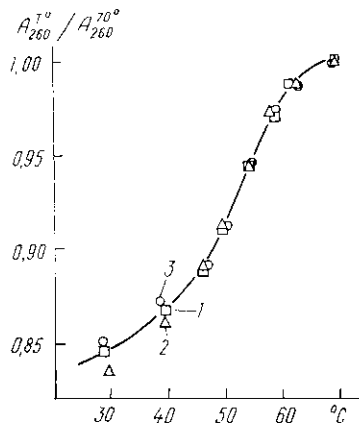
**Получение и характеристика d(N)<sub>17</sub>.** Гептадекануклеотид (CCAGACTGAAGATCTGG) синтезирован автоматическим фосфитамидным методом на синтезаторе «Виктория-4М» [13]. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения регистрировали при 260 нм в 0,02 М трис-НСl, рН 7,5, 0,02 М Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 0,1 М NH<sub>4</sub>Cl на спектрофотометре «Cary 215» (США), снабженном термостатируемым кюветодержателем и блоком для измерения температуры. Кривые плавления снимали при непрерывном повышении температуры со скоростью 1 °С/мин. Концентрация олигонуклеотида, выраженная через концентрацию нуклеотидного звена, составляла 0,5·10<sup>-2</sup>, 0,3·10<sup>-3</sup>, 0,3·10<sup>-4</sup> М. Коэффициент молярной экстинкции нуклеотидного звена определяли как среднее арифметическое коэффициентов молярной экстинкции составляющих нуклеотидных звеньев. E<sub>260</sub> = 11240 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. 5'-Фосфорилирование d(N)<sub>17</sub> выполнено с помощью [<sup>32</sup>P]АТФ и Т4-полинуклеотидкиназы по [14] с последующей очисткой электрофорезом в 20 %-ном полиакриламидном геле. Удельная активность меченого олигонуклеотида составляла 111—370 ГБк/ммоль. Препарат использовали сразу после мечения.

**Получение [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>.** Суммарная тРНК была выделена фенольной экстракцией из пекарских дрожжей [15]. Очищенная [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (1600 пмоль [<sup>14</sup>C]фенилаланина на 1 о. е. A<sub>260</sub>) получена двойной хроматографией на БД-целлюлозной колонке (в деацилированной и аминоацилированной формах) по методу Гиллама и Тенера [16]. Препарат хранили в растворе при —50 °С.

Связывание d(N)<sub>17</sub> и Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с рибосомами проводили в буфере: 0,02 М трис-НСl, рН 7,6, 0,02 или 0,03 М MgCl<sub>2</sub>, 0,1 М NH<sub>4</sub>Cl. Пробы (50 мкл) содержали поли(U) (5 мкг) или поли(dT) (3 мкг). В пробах, содержащих неомидин, концентрация его составляла 100 мкМ. Условия инкубации с 30S субчастицами рибосом (27 пмоль): 100 мин, 2 °С, d(N)<sub>17</sub> — 7 пмоль (111 ГБк/ммоль), Phe-тРНК<sup>Phe</sup> — 18 пмоль (13,3 ГБк/ммоль). Условия инкубации с 40S субчастицами рибосом (12 пмоль): 30 мин, 20 °С, d(N)<sub>17</sub> — 0,7 пмоля (370 ГБк/ммоль), Phe-тРНК<sup>Phe</sup> — 14 пмоль (13,3 ГБк/ммоль). Количество связанного с рибосомами материала определяли с помощью фильтрования через нитроцеллюлозные фильтры по методу Ниренберга и Лелера [17].

**Результаты и обсуждение.** Исследуемый олигонуклеотид имеет на концах комплементарные последовательности и потенциально способен образовывать как внутримолекулярные шпильчатые структуры, так и межмолекулярные димеры с внутренними петлями и агрегаты более высокого порядка. В общем случае возможно сосуществование обеих форм, причем соотношение между ними зависит от концентрации, длины комплементарной области, ее GC-состава, а также от длины и нуклеотидного состава петли [18, 19].

На рисунке приведена кривая плавления изучаемого 17-членного дезоксирибоолигонуклеотида. Однофазный профиль кривой свидетельствует о том, что в растворе образуется лишь один из возможных типов структур [19]. Кривые плавления  $d(N)_{17}$  практически совпадают в диа-



пазоне концентраций от  $0,5 \cdot 10^{-2}$  до  $0,3 \times 10^{-4}$  М нуклеотидных звеньев. Усредненная  $T_{пл} — 50 \pm 1$  °С, гиперхромный эффект в интервале плавления —  $16 \pm 2$  %. Отсутствие концентрационной зависимости  $T_{пл}$  олигомеров однозначно свидетельствует об образовании внутримолекулярной «шпильки».

Нормализованная кривая плавления  $d(N)_{17}$  при различных концентрациях олигомера: 1— $0,5 \cdot 10^{-2}$ ; 2— $0,3 \cdot 10^{-3}$ ; 3— $0,3 \cdot 10^{-4}$  М

Normalized melting curve of  $d(N)_{17}$  with different oligonucleotide concentrations: 1— $0,5 \cdot 10^{-2}$  М; 2— $0,3 \cdot 10^{-3}$  М; 3— $0,3 \cdot 10^{-4}$  М

Результаты по связыванию  $d(N)_{17}$  и Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с рибосомами представлены в таблице. В то время как Phe-тРНК<sup>Phe</sup> хорошо связывается с рибосомами, дезоксирибоаналог ее антикодоновой ветви не обладает этим свойством. Предварительная инкубация  $d(N)_{17}$  в течение 5 мин при 100 °С с последующим резким охлаждением (условия, стимулирующие образование исключительно внутримолекулярных «шпилек») не изменяла ситуации. Следует подчеркнуть, что исходя из данных, приведенных в [9], концентрации субстратов и время инкубации являются достаточными для образования регистрируемого комплекса природной антикодоновой ветви тРНК с рибосомами.

Таким образом, малые субчастицы прокариотических (*E. coli*) и эукариотических (печень кролика) рибосом не способны к заметному кодон-зависимому связыванию дезоксирибоаналога антикодоновой ветви тРНК<sup>Phe</sup> в присутствии как рибо-(поли(U)), так и дезоксирибоолигонуклеотидной (поли(dT)) матрицы. Связывание не усилилось под влиянием антибиотика неомицина. Как ранее показано [20], Phe-тРНК<sup>Phe</sup> связывается с поли(U)- и поли(dT)-программированными 30S субчастицами как в отсутствие, так и в присутствии неомицина.

Несмотря на принципиальную возможность комплементарного кодон-антикодонного взаимодействия синтетического аналога с поли(U) или поли(dT), образования тройного комплекса с рибосомой не происходит. Это еще раз свидетельствует о том, что комплементарность ко-

*Связывание  $d(N)_{17}$  и Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с малыми субчастицами рибосом *E. coli* и печени кролика (пмоль связанного материала / 50 мкл пробы)*

*Binding of  $d(N)_{17}$  and Phe-tRNA<sup>Phe</sup> to *Escherichia coli* and rabbit liver small ribosomal subunits (pmoles of bound material per 50  $\mu$ l assay)*

Лиганд	Без матрицы	Поли(U)	Поли(dT)	Поли(U), неомицин	Поли(dT), неомицин
30S субчастицы					
$d(N)_{17}$	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Phe-тРНК <sup>Phe</sup>	<0,005	11	2	—	—
40S субчастицы					
$d(N)_{17}$	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Phe-тРНК <sup>Phe</sup>	<0,005	8,3	<0,005	—	—

дона и антикодона является необходимым но, не достаточным условием связывания субстрата рибосомой.

Полученный отрицательный результат лишь отчасти может быть объяснен отсутствием модифицированных оснований в аналоге антикодонной ветви тРНК<sup>Phe</sup>. По нашим предварительным данным, синтетический рибогептадекануклеотид, имеющий такой же нуклеотидный состав, что и изучаемый дезоксирибоолигонуклеотид, связывался с поли(U)-программированными рибосомами. Правда, уровень такого связывания был примерно в 5—7 раз ниже, чем для Phe-тРНК<sup>Phe</sup>.

Основные причины отсутствия связывания дезоксирибоаналога антикодонной ветви тРНК<sup>Phe</sup> могут состоять в следующем: а) необходимости прямого участия 2'-гидроксильных групп во взаимодействии с рибосомным комплексом; б) опосредованном влиянии 2'-гидроксильных групп на взаимодействие ветви с рибосомой за счет предопределения такой конформации антикодона, в которой он не способен образовывать стабильные кодон-антикодонные комплексы на рибосоме. В последнем случае большая роль может сыграть то обстоятельство, что в стебле олигонуклеотидная спираль, видимо, находится в В-конформации, характерной для ДНК, влияя тем самым на пространственное расположение нуклеотидов в петле. Геометрия же антикодонной петли существенна для комплементарного спаривания с кодоном [21].

Исходя из вышесказанного, с большой вероятностью можно ожидать, что и дезоксирибоаналог полной молекулы тРНК<sup>Phe</sup> также не будет способен кодон-зависимо связываться с рибосомами.

Полученные данные согласуются с гипотезой о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосоме. Выяснение конкретной причины отсутствия кодон-зависимого связывания дезоксирибоаналога антикодонной ветви тРНК<sup>Phe</sup> с малыми субчастицами про- и эукариотических рибосом требует дополнительного исследования.

Авторы благодарят В. В. Махно за предоставленный препарат субчастиц рибосом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // FEBS Lett.—1982.—146, N 1.—P. 5—8.
2. Потапов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.—1985.—46, № 1.—С. 63—77.
3. Потапов А. П. Стереоспецифический механизм отбора аминоксил-тРНК рибосомой // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1982.—№ 6.—С. 100—102.
4. Потапов А. П. Механизм транслокации пептидил-тРНК и мРНК в рибосоме // Там же.—С. 73—75.
5. McCarthy B. J., Holland J. J. Denaturated DNA as a direct template for *in vitro* protein synthesis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1965.—54, N 3.—P. 880—886.
6. Morgan A. R., Wells R. D., Khorana H. G. Studies on polynucleotides. 74. Direct translation *in vitro* of single-stranded DNA-like polymers with repeating nucleotide sequences in the presence of neomycin B // J. Mol. Biol.—1967.—26, N 3.—P. 477—497.
7. Сравнительное изучение матричной активности поли(U) и поли(dT) в бесклеточных белоксинтезирующих системах из *Escherichia coli* и зародышей пшеницы / А. П. Потапов, К. А. Солдаткин, А. П. Солдаткина, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 3.—С. 133—138.
8. A structural requirements for codon-anticodon interaction on the ribosomes / S. K. Dube, P. S. Rudland, B. F. C. Clark, K. A. Marcker // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1969.—34.—P. 161—166.
9. Rose III S. J., Lowary P. T., Uhlenbeck O. C. Binding of yeast tRNA<sup>Phe</sup> anticodon arm to *Escherichia coli* 30S ribosomes // J. Mol. Biol.—1983.—167, N 1.—P. 103—117.
10. Нехай С. А., Саминский Е. М. Связывание фрагмента фенилаланиновой тРНК из дрожжей, содержащего антикодонную петлю, с 30S субчастицами и 70S рибосомами *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 2.—С. 62—69.
11. Enzymatic synthesis and some properties of a model primitiv tRNA / M. Kinjo, T. Hasegawa, K. Nagano et al. // J. Mol. Evol.—1986.—23, N 4.—P. 320—327.

12. Falvey A. K., Staechelin T. Structure and function of mammalian ribosomes. I. Isolation and characterization of active liver ribosomal subunits // J. Mol. Biol.—1970.—53, N 1.—P. 1—9.
13. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов фосфитамидным методом на установке «Виктория-4М» / С. М. Грязнов, В. К. Потапов, А. А. Елов и др. // Биол. орг. химия.—1986.—12, № 7.—С. 988—991.
14. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 2.—P. 560—564.
15. Zubay C. The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid // J. Mol. Biol.—1962.—4, N 3.—P. 347—356.
16. Gillam J. C., Tener C. M. The use BD-cellulose in separation of transfer RNA's // Meth. Enzymol.—1971.—20, pt C.—P. 55—70.
17. Nirenberg M., Leder P. RNA codewords and protein synthesis // Science.—1964.—145, N 3639.—P. 1399—1407.
18. Duplex-hairpin transitions in DNA: NMR studies on CGCGTATACGCG / D. E. Weninger, S. H. Chou, D. R. Hare, B. R. Reid // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 10.—P. 3755—3765.
19. Hairpin formation in synthetic oligonucleotides / C. W. Hilbers, C. A. G. Haasroot, S. H. de Bruijn et al. // Biochimic.—1985.—67, N 7.—P. 685—695.
20. Изучение поли(U) и поли(dT)-зависимого связывания Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с 30S субъединицами рибосом *Escherichia coli* / К. А. Солдаткин, А. П. Потапов, А. П. Солдаткина, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 4.—С. 193—196.
21. Grosjean H., Houssier C., Cedergren R. Anticodon-anticodon interactions and tRNA sequence comparison: approaches to codon recognition // Nato adv. res. workshop—Rennes, 1985.—P. 1—15.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
МГУ им. М. В. Ломоносова

Получено 23.04.88

DEOXYRIBOANALOG OF THE ANTICODON ARM OF YEAST tRNA<sup>Phe</sup>  
IS NOT ABLE TO CODON-DEPENDENT BINDING TO SMALL RIBOSOMAL  
SUBUNITS OF ESCHERICHIA COLI AND THE RABBIT LIVER

K. A. Soldatkin, O. V. Kovalchuk, A. P. Potapov, A. V. Elskaya,  
N. F. Krynetskaya, N. G. Dolinnaya, Z. A. Shabarova

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Oligonucleotide d(CCAGACTGAAGATCTGG) has been used to study influence of sugar-phosphate backbone modifications on the interaction of tRNA anticodon region with ribosomes. Its sequence corresponds to nonmodified tRNA<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub> anticodon arm. The oligonucleotide is shown to form an intramolecular «loop», but nevertheless it is not able to be bound to 30S and 40S ribosomes of *E. coli* and rabbit liver in the presence of ribo-(poly(U)) or deoxyribo-(poly(dT)) messenger. The addition of neomycin B promotes changes in the situation.

УДК 547.963.3

Д. Б. Беглов, А. А. Липанов, В. П. Чуприна

СТЕРИЧЕСКАЯ ДОСТУПНОСТЬ ДНК ДЛЯ МОЛЕКУЛ ВОДЫ  
И ИОНОВ ПРИ В — D-ПЕРЕХОДЕ \*

Методом Ли и Ричардса рассчитана стерическая доступность атомов ДНК в В- и D-формах для молекул воды. Показано, что уменьшение доступности нуклеотидов в D-форме, отражающее более экономную гидратацию D-конформации по сравнению с В-конформацией ДНК, происходит главным образом за счет сужения гликозидного желобка двойной спирали. Оценена также доступность D-формы для ионов натрия. По результатам расчетов обсужден механизм В — D-перехода в АТ-богатых ДНК.

\* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.