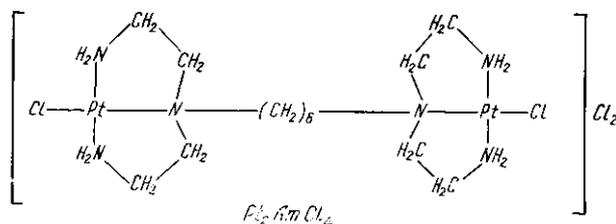


П. Г. Чистяков, М. А. Абдукаюмов, А. Г. Веньямина, С. Н. Владимиров,  
Д. М. Грайфер, С. А. Казаков, Г. Г. Карпова

**рРНК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ  
В 70S РИБОСОМАХ *ESCHERICHIA COLI*  
И В КОМПЛЕКСЕ ИНИЦИАЦИИ ПО ДАННЫМ СШИВОК  
БИФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ПРОИЗВОДНЫМ ПЛАТИНЫ (II)**

*Исследованы рРНК-белковые сшивки в 70S рибосомах, меченных  $^{35}\text{S}$ , в свободном состоянии и в составе комплекса инициации рибосома·AUGU<sub>6</sub>·fMet-тРНК<sup>fMet</sup> с использованием бифункционального реагента {дихлор[N,N,N',N'-тетраakis-(2-аминоэтил)-1,6-гексаметилендиаминдиплатина]}дихлорид. Наборы белков, сшивающихся с 16S и 23S рРНК в свободных 70S рибосомах и в комплексе рибосом с матрицей и инициаторной тРНК, различаются незначительно.*

**Введение.** Для изучения функциональной топографии рибосом все большее применение находят бифункциональные химические реагенты, способные образовывать сшивки между нуклеиновыми кислотами и белками [1]. К числу наиболее перспективных сшивающих реагентов принадлежат соединения платины. Ранее было показано, что бифункциональные платиновые реагенты образуют сшивки между биополимерами, входящими в состав таких нуклеопротеидов, как хроматин [2], вирусы [3], 30S рибосомные субчастицы [4], а также комплексы тРНК·аминоацил-тРНК синтетаза [4, 5], IF-3·30S субчастица [6], EF-Tu·Phe-тРНК<sup>Phe</sup> [7]. Недавно была продемонстрирована возможность использования платиновых реагентов для изучения взаимодействия тРНК и мРНК с рибосомой в соответствующих комплексах [8]. Однако практически все работы по исследованию рРНК-белковых сшивок в рибосомах с помощью бифункциональных реагентов выполнены на изолированных 70S рибосомах или рибосомных субчастицах. Данные по рРНК-белковым сшивкам в составе комплексов рибосом с мРНК и тРНК полностью отсутствуют. С другой стороны, результаты подобных исследований, выполненных с помощью метода прямых УФ-индуцированных сшивок [9, 10], свидетельствуют об изменении рРНК-белковых контактов в зависимости от функционального состояния рибосом. В настоящей работе с использованием реагента {дихлор-[N,N,N',N'-тетраakis-(2-аминоэтил)-1,6-гексаметилендиаминдиплатина]}дихлорид (Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub>) изучены рРНК-белковые сшивки в изолированных 70S рибосомах, меченных  $^{35}\text{S}$ , и в составе комплекса инициации [ $^{35}\text{S}$ ]70S рибосома·AUGU<sub>6</sub>·fMet-тРНК<sup>fMet</sup>.



**Материалы и методы.** В работе использовали тРНК<sup>fMet</sup> фирмы «Boehringer Mannheim» (ФРГ). [ $^{35}\text{S}$ ]30S и [ $^{35}\text{S}$ ]50S рибосомные субчастицы получали, как описано в [11]. Препарат AUGU<sub>6</sub> и [ $^{35}\text{S}$ ]fMet-тРНК<sup>fMet</sup> получали по методике, описанной в [12]. Степень аминоацилирования составляла 1200 пмоль, а степень формилирования — 900 пмоль/1 OE<sub>250</sub>. Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub> синтезировали по [13]. Активность рибосом в поли(U)-зависимом синтезе (Phe)<sub>2</sub> тестировали по [11]. Для получения комплекса, условно обозначенного нами как «комплекс инициации», смесь, содержащую 180 пмоль [ $^{35}\text{S}$ ]30S субчастиц и 3720 пмоль AUGU<sub>6</sub>, инкубировали 5 мин при 0 °С в 160 мкл буфера связывания (20 мМ трис-HNO<sub>3</sub>, pH 7,5, 100 мМ KNO<sub>3</sub>, 10 мМ Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Затем добавляли 180 пмоль  $[Met-tRNA^{Met}]$  в 40 мкл буфера связывания и выдерживали 10 мин при 0°C. После этого в полученную смесь вносили 186 пмоль  $[^{35}S]50S$  субчастиц в 40 мкл буфера связывания. Комплексы инициации и свободные  $[^{35}S]70S$  рибосомы выдерживали с 1 мМ  $Pt_2AmCl_4$  при 20°C в течение 50 мин. Разделение 70S рибосом, обработанных  $Pt_2AmCl_4$ , на субчастицы проводили, как описано в [8], комплексе инициации предварительно разрушали с помощью 0,1 М ЭДТА. рРНК-белковые сшивки выделяли по [8] и разрушали обработкой 2 М тиомочевой при pH 3,5 (инкубация при 37°C в течение 1 ч). Анализ рибосомных белков проводили двухмерным электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) по модифицированной методике [14], добавляя меченные белки в качестве носителя. В первом направлении электрофорез осуществляли в стеклянных капиллярах размером 0,5×70 мм. Пробу белков в объеме 2–2,5 мкл наносили на слой концентрирующего геля длиной 2,5 мм. Электрофорез вели при силе тока 0,5 мА на капилляр в течение 1,5 ч для разделения кислых белков и силе тока 1 мА в течение 1 ч — для основных белков. Электрофорез во втором направлении вели в 22 %-ном ПААГ (pH геля 4,3) в пластинках размером 70×90 мм при толщине прокладок 0,5 мм и 20°C в течение 1 ч. Стабилизация источника напряжения по току 22 мА (охлаждение вентилятором). В отдельных экспериментах кислые белки подвергали гель-электрофорезу, используя 18 %-ный ПААГ (pH геля 4,5) [14] и увеличивая время электрофореза в первом и втором направлениях до 4,5 и 3 ч соответственно, для разделения белков *L7/L12* и *S6*.

**Результаты и обсуждение.** Комплексы инициации  $[Met-tRNA^{Met} \cdot AUGU_6 \cdot ^{35}S]70S$  рибосома получали в буфере связывания, содержащем 10 мМ  $Mg^{2+}$ . В параллельном эксперименте, выполненном на меченых рибосомах, методом фильтрации тройного комплекса через нитроцеллюлозные фильтры было показано, что степень связывания  $[Met-tRNA^{Met}]$  с рибосомами составляет 0,5 моля на моль рибосом. В отсутствие матрицы связывания не наблюдалось. Для получения рРНК-белковых сшивок  $[^{35}S]70S$  рибосомы и комплексы инициации  $[^{35}S]70S$  рибосома  $\cdot AUGU_6 \cdot [Met-tRNA^{Met}]$  обрабатывали 1 мМ  $Pt_2AmCl_4$  при 20°C. В контрольном эксперименте на меченых рибосомах было показано, что диссоциации комплекса инициации после обработки 1 мМ реагентом практически не происходит. Более того, даже предынкубация рибосом с  $Pt_2AmCl_4$  не приводит к их значительной инактивации (по крайней мере в системе поли(U)-зависимого синтеза дифенилаланина). Так, уровень связывания  $[^{14}C]Phe-tRNA^{Phe}$  на рибосомах, контрольных и обработанных реагентом, составляет 1,77 и 1,36 моля тРНК на моль рибосом; уровень синтеза дифенилаланина на обработанных  $Pt_2AmCl_4$  рибосомах составлял не менее 60 % от такового в контрольном эксперименте. Обработанные  $Pt_2AmCl_4$  реакционные смеси подвергали центрифугированию в градиенте плотности сахарозы (15–30 %) в условиях диссоциации рибосом на субчастицы (1 мМ  $Mg^{2+}$ ). Часть 70S рибосом (около 10 %) не диссоциировала на субчастицы из-за образования межсубъединичных сшивок как в свободных 70S рибосомах, так и в составе комплекса инициации. Для определения степени ковалентного присоединения  $[^{35}S]$ рибосомных белков к рРНК  $[^{35}S]$ рибосомные субчастицы и  $[^{35}S]70S$  рибосомы (не диссоциировавшие на субчастицы) подвергали центрифугированию в градиенте плотности сахарозы (5–20 %) в присутствии ЭДТА и DS-Na (условия диссоциации рибосом на рРНК и белки [8]). Фракции, соответствующие материалу с коэффициентом седиментации несколько большим, чем для 16S (23S) рРНК, содержали значительное количество радиоактивности. Очевидно, эта радиоактивность соответствовала сшивкам рРНК с  $[^{35}S]$ белками. В контрольном эксперименте центрифугированию в условиях диссоциации на рРНК и белки подвергали  $[^{35}S]$ рибосомные субчастицы, не обработанные платиновым реагентом. В этом случае фракции рРНК практически не содержали радиоактивности. Степени ковалентного присоединения  $[^{35}S]$ рибосомных белков к рРНК приведены в таблице. Видно, что как в изолированных 70S рибосомах, так и в комплексе инициации степень «пришивки»  $[^{35}S]$ белков к 16S рРНК несколько выше, чем к 23S рРНК. Кроме того, заметна тенденция уменьшения степени «при-

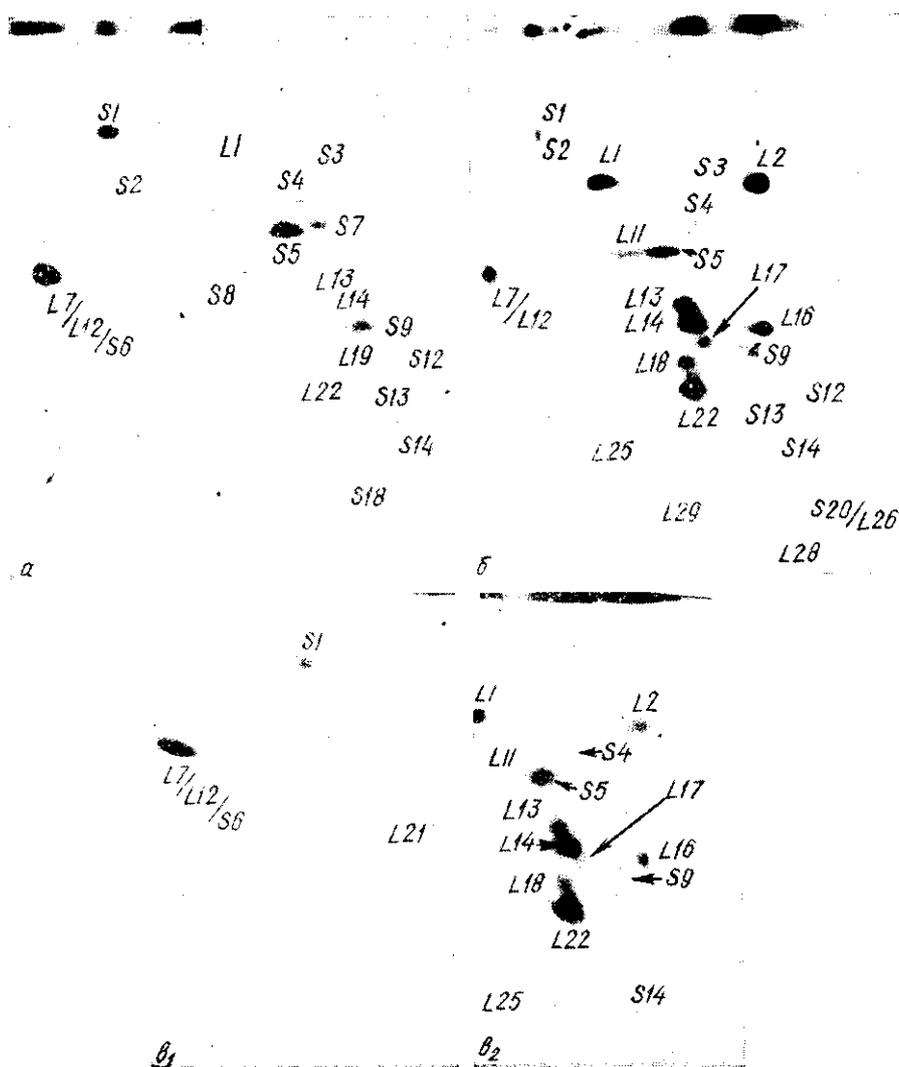


Рис. 1. Электрофореграмма [<sup>35</sup>S]рибосомных белков, сшитых с рРНК после обработки 70S [<sup>35</sup>S]рибосом Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub>: а — в 30S субчастицах; б — в 50S субчастицах; в — в сшитых (30S—50S) субчастицах (1, 2 — кислые и основные белки соответственно). Радиоавтограф

Fig. 1. Identification by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of [<sup>35</sup>S]proteins cross-linked to rRNA after the treatment of 70S [<sup>35</sup>S]ribosomes with Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub>: а — in 30S subunits; б — in 50S subunits; в — in (30S-50S) intersubunit cross-links (1, 2 — acid and basic proteins, respectively). Autoradiography of the gel

Степень ковалентного присоединения [<sup>35</sup>S]белков к рРНК в свободных рибосомах и в составе комплекса инициации при обработке Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub>

Extent of covalent attachment of [<sup>35</sup>S]proteins to rRNA in free ribosomes and in the initiation complex after the treatment with Pt<sub>2</sub>AmCl<sub>4</sub>

Состояние 70S рибосом	Субчастицы	Степень присоединения, %	Состояние 70S рибосом	Субчастицы	Степень присоединения, %
Свободные	(30S—50S)	41	Комплекс инициации	(30S—50S)	33
	50S	29		50S	26
	30S	36		30S	31

Примечание. За 100 % принято общее содержание радиоактивности в белках.

шивки» белков к рРНК в составе комплекса инициации по сравнению со свободными рибосомами. Фракции, соответствующие рРНК-белковым сшивкам, обрабатывали 2 М тиомочевинной при рН 3,5. В этих ус-

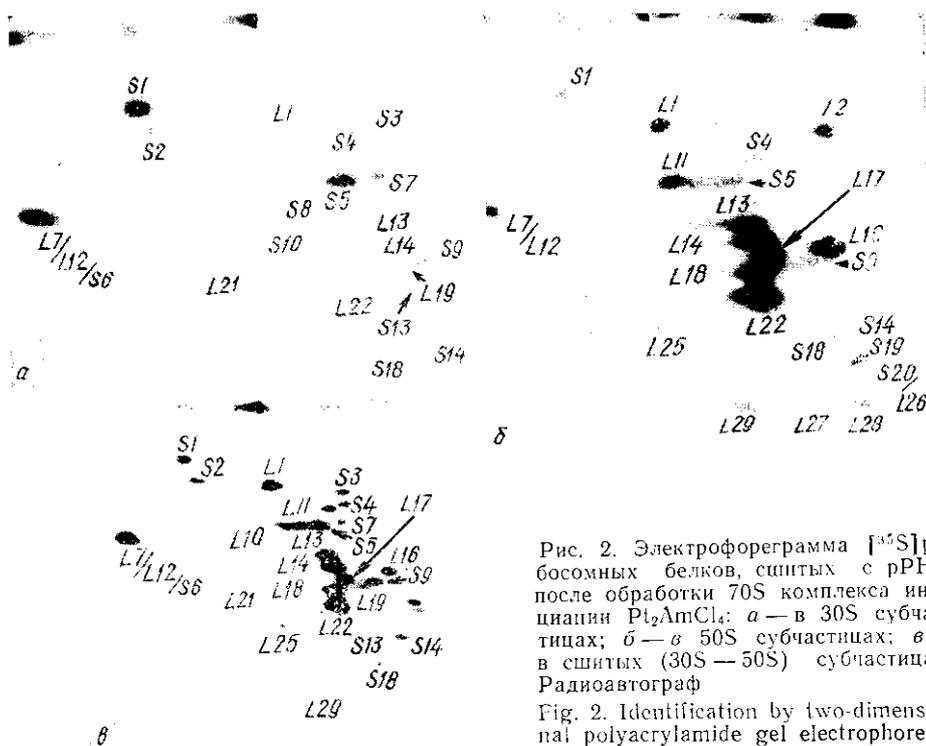


Рис. 2. Электрофореграмма  $[^{35}\text{S}]$ рибосомных белков, сшитых с рРНК после обработки 70S комплекса инициации  $\text{Pt}_2\text{AmCl}_4$ : а — в 30S субчастицах; б — в 50S субчастицах; в — в сшитых (30S — 50S) субчастицах. Радиоавтограф

Fig. 2. Identification by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of  $[^{35}\text{S}]$ proteins cross-linked to rRNA

after the treatment of the 70S initiation complex with  $\text{Pt}_2\text{AmCl}_4$ : а — in 30S subunits; б — in 50S subunits; в — in (30S-50S) intersubunit cross-links. Autoradiography of

ловиях сшивки рРНК с белками полностью разрушаются. На рис. 1 и 2 представлены результаты анализа  $[^{35}\text{S}]$ белков, сшивающихся с рРНК, двухмерным геле-электрофорезом. Типичная электрофореграмма  $[^{35}\text{S}]$ рибосомных белков после прокрашивания геля кумасси приведена на рис. 3. Следует отметить, что в отдельных экспериментах дополнительным анализом кислых белков (см. «Материалы и методы») проводили разделение белков L7/L12 и S6. Из результатов, представленных на рис. 1 и 2, видно, что с 16S рРНК как в свободных рибосомах, так и в комплексе инициации сшиваются  $[^{35}\text{S}]$ белки, которые можно разделить на две группы по интенсивности пятен на радиоавтографе: 1) L7/L12/S6 (при дополнительном анализе

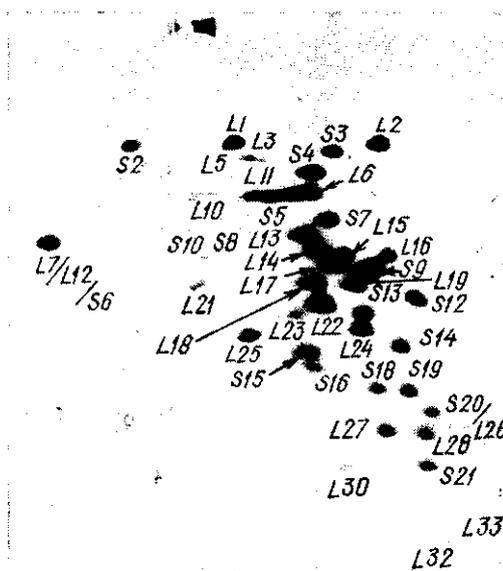


Рис. 3. Типичная электрофореграмма  $[^{35}\text{S}]$ рибосомных белков после прокрашивания геля кумасси

Fig. 3. Typical two-dimensional polyacrylamide gel electrophoregram of  $[^{35}\text{S}]$ proteins after staining of the gel with Coomassie

кислых белков были обнаружены пятна L7/L12 и S6), S1 и S5 (основная группа) и 2) S2 — S4, S7 — S9, S14, S18, L1, L13, L14, L19, L22. Слабое пятно белка S12 наблюдалось только в случае свободных 70S

рибосом, а белка *L21* — только в случае 70S комплекса инициации (для сравнения см. рис. 1, *a* и 2, *a*). Аналогично, белки, сшитые с 23S рРНК в свободных рибосомах, можно разделить на группы 1) *L1, L2, L11, L7/L12* (в этом случае белок *S6* не обнаружен), *L13, L14, L15, L18, L22, S5* и 2) *S1—S4, S9, S12—S14, S20/L26, L25, L28, L29*. В составе комплекса инициации были идентифицированы сходные наборы белков с несколькими исключениями: слабые пятна белков *S2, S3* и *S13* исчезают, интенсивность пятна *L28* резко возрастает и появляются слабые пятна белков *S18, S19* и *L27* (см. рис. 1, *б* и 2, *б*). Во фракции 30S — 50S межсубъединичных сшивок (см. рис. 1, *в* и 2, *в*) наблюдается более выраженная разница между наборами белков, сшитых с рРНК в свободных рибосомах и в составе комплекса инициации: слабые пятна белков *S2, S3, S7, S12, S18, L10, L19, L29* наблюдаются только в случае комплекса инициации, в то время как интенсивное пятно *L2* — только в случае свободных рибосом. Наличие белков 30S субчастицы, сшитых с 23S рРНК, во фракции 50S субчастиц и белков 50S субчастицы, сшитых с 16S рРНК, во фракции 30S субчастиц свидетельствует о том, что при диссоциации 70S рибосом белки одной субчастицы, сшитые с рРНК другой субчастицы, отрываются от «своей» субчастицы и переходят в другую, с рРНК которой они ковалентно связаны.

Модификации платиновыми реагентами может подвергаться целый ряд функциональных групп в рРНК и белках, реакционная способность которых при  $\text{pH} \approx 7$  убывает следующим образом:  $\text{N7 (G)} > \text{N7; N1 (A)} > \text{N3 (C)} > \text{N3 (U)}$  в рРНК и  $-\text{SCH}_3 (\text{Met}) > -\text{SH (Cys)} > > \text{N (His)} > -\text{NH}_2 (\text{Lys})$  — в белках [2, 3]. Как видно из таблицы обработки  $[\text{^{35}S}]70\text{S}$  рибосом и комплекса инициации  $[\text{^{35}S}]70\text{S}$  рибосома  $\cdot \text{AUGU}_6 \cdot [\text{Met-tРНК}^{\text{Met}}, 1 \text{ мМ Pt}_2\text{AmCl}_4$  приводит к образованию рРНК-белковых сшивок с высоким выходом. Образованные платиновыми соединениями продукты сшивок устойчивы в условиях выделения и анализа, но легко расщепляются в мягких условиях под действием тиомочевины. При этом происходит полная демодификация сшитых фрагментов белков и нуклеиновых кислот.

Наборы белков, сшивающихся с 16S и 23S рРНК с помощью  $\text{Pt}_2\text{AmCl}_4$  в свободных рибосомах и в комплексе инициации, несколько различаются. Различия касаются, в основном, наборов белков, имеющих относительно низкую интенсивность пятен на радиоавтографах (см. рис. 1 и 2), и, по-видимому, отражают незначительные изменения в рРНК-белковых контактах, происходящие в рибосоме при взаимодействии с матрицей и инициаторной тРНК. Однако следует учитывать, что некоторые рРНК-белковые сшивки, появляющиеся в комплексе инициации, но отсутствующие в свободных 70S рибосомах, могут быть не связаны с изменением рРНК-белковых контактов и осуществляются через тРНК (сшивки рРНК-тРНК-белок).

Недавно были обнаружены сшивки белков *S3, S4, S11, S13/S14, S18* с 16S рРНК при обработке 30S субчастиц транс-диаминодихлорплатиной [4]. Белки *S3, S4, S14, S18* входят в набор белков, сшивающихся с 16S рРНК с помощью  $\text{Pt}_2\text{AmCl}_4$  в свободных рибосомах и в комплексе инициации. Очевидно, что использование реагента  $\text{Pt-AmCl}_4$ , обладающего гибкой мостиковой группой (расстояние между сшитыми функциональными группами биополимеров  $\sim 1,5$  нм), открывает возможность получения других вариантов специфических сшивок по сравнению с транс-диаминодихлорплатиной [4], имеющей жесткое линейное строение (расстояние между сшитыми группами  $\sim 0,5$  нм).

Химические сшивки белков *L1, L27* и *L29* с 23S рРНК были известны ранее (см. обзоры [1, 15]), остальные 23S рРНК-белковые сшивки обнаружены впервые. Непосредственное соседство белков *S3, S4, S7, S9, S18* с 16S рРНК и белков *L1, L2* с 23S рРНК ранее было установлено методом прямых УФ-индуцированных сшивок [9, 10, 16]. Ряд данных по химическим сшивкам подтверждает соседство белков *S1, S4, S7, S8* и *S12* с 16S рРНК [1, 15, 17, 18]. Прямой контакт белка *L1* с

16S рРНК ранее наблюдали в работе [10] при УФ-облучении как изолированных 70S рибосом, так и пре- и посттранслокационных комплексов. Данные по сшивкам белка *L1* с 16S рРНК хорошо согласуются с соответствующими моделями 70S рибосомы, согласно которым «головка» 30S субчастицы тесно примыкает к ребру *L1* [19, 20]. Сшивки белка *L7/L12* с 16S рРНК ранее не наблюдали. Возможно, сшивка этого белка с 16S рРНК происходит через один из белков 30S субчастицы, сшивающихся с 16S рРНК. Однако при изучении белок-белковых контактов в составе 70S рибосом с помощью различных бифункциональных реагентов сшивки белка *L7/L12* с белками 30S субчастицы не были зарегистрированы ни разу. Поэтому вероятнее всего, что белок *L7/L12* сшивается непосредственно с 16S рРНК. Следовательно, можно предположить, что «стержень» *L7/L12* (одни из димеров *L7/L12*) примыкает к одному из участков 16S рРНК (расстояние  $\approx 1,5$  нм) как в свободных 70S рибосомах, так и в комплексе рибосом с матрицей и инициаторной тРНК.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brimacombe R., Stiege W. Structure and function of ribosomal RNA // Biochem. J.—1985.—229, N 1.—P. 1—17.
2. Crosslinking of chromosomal proteins to DNA in *HeLa* cells by UV, gamma radiation and some antitumor drugs / Z. M. Banjar, L. S. Hnilica, R. C. Briggs et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1983.—114, N 2.—P. 767—773.
3. *In vivo* effect of cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II) on SV40 chromosomes differential repair, DNA-protein cross-linking and inhibition of replication / R. B. Ciccarelli, M. J. Solomon, A. Varshavsky, S. I. Lippard // Biochemistry.—1985.—24, N 26.—P. 7533—7540.
4. Trans-diamminedichloroplatinum (II), a reversible RNA-protein cross-linking agent. Application to the ribosome and an aminoacyl-tRNA synthetase / tRNA complex / M. A. Tukalo, M. D. Kuller, D. Kern et al. // Ibid.—1987.—26, N 16.—P. 5200—5208.
5. Платиновые производные — сшивающие реагенты для исследования взаимодействия тРНК с аминоацил-тРНК синтетазами / М. А. Тукало, О. Т. Рожко, Г. Х. Мацука и др. // Докл. АН СССР.—1985.—280, № 6.—С. 1484—1487.
6. Cross-linking of initiation factor IF-3 to *E. coli* 30S ribosomal subunits by trans-diamminedichloroplatinum (II): characterization of two cross-linking sites in 16S RNA, a possible way of functioning for IF-3 / C. Ehresmann, H. Moine, M. Mougel et al. // Nucl. Acids Res.—1986.—14, N 2.—P. 4803—4821.
7. Crosslinking of elongation factor Tu to tRNA<sup>Phe</sup> by trans-diamminedichloroplatinum (II). Characterization of two cross-linking sites in the tRNA / E. P. Wikman, P. Romby, M. H. Metz et al. // Ibid.—1987.—15, N 14.—P. 5787—5831.
8. Применение сшивающих платиновых реагентов для изучения взаимодействия тРНК и мРНК с рибосомами / С. Н. Владимиров, Д. М. Грайфер, М. А. Зенкова и др. // Биорг. химия.—1987.—13, № 8.—С. 1053—1058.
9. Контакты рибосомных белков с тРНК<sup>Phe</sup> и 16S РНК в аналогах 30S инициаторного комплекса / Г. Г. Абдурашидова, М. Г. Нурдизин, Н. В. Руденко и др. // Молекуляр. биология.—1985.—19, № 2.—С. 553—557.
10. Intersubunit RNA-protein contacts in pre- and posttranslocated *E. coli* ribosome / G. G. Abdurashidova, E. A. Tsvetkova, A. A. Chernyi et al. // FEBS Lett.—1985.—185, N 2.—P. 291—294.
11. Получение 70S рибосом *Escherichia coli*, меченных <sup>35</sup>S / М. Абдукаюмов, О. И. Гимаутдинова, Д. М. Грайфер и др. // Биохимия.—1987.—52, № 9.—С. 1411—1415.
12. Исследование мРНК-связывающей области рибосомы на разных этапах трансляции. I. Функциональная активность аналогов мРНК — AUGGG, и его бензилдиэтиловых производных — в рибосомнозависимом белковом синтезе / Г. Г. Бабаева, Г. Г. Карпова, В. А. Берлин и др. // Биорг. химия.—1982.—9, № 11.—С. 1535—1543.
13. Власов В. В., Казиков С. А., Мисовен В. Г. Синтез дериватов селениевой (2411) с N,N,N',N'-тетраки-(2-аминоэтил)-1,6-гексаметилендиамином // Докл. АН СССР.—1982.—266, № 4.—С. 866—870.
14. The proteins of the messenger RNA binding site of *Escherichia coli* ribosomes / O. I. Gimantdinova, G. G. Karpova, D. G. Knorre, N. D. Kobetz // Nucl. Acids Res.—1981.—9, N 4.—P. 3165—3172.
15. RNA structure and RNA-protein neighbourhoods in the ribosome / R. Brimacombe, J. Almadja, A. Kyriatoulis, W. Stiege // Structure, function and genetics of ribosomes / Eds B. Hardesty, G. Kramer.—New York: Springer, 1986.—P. 184—202.
16. Induction of polynucleotide-protein cross-linkages by ultraviolet irradiation. Peculiarities of the high intensity laser pulse irradiation / E. I. Budowsky, M. S. Axentieva, G. G. Abdurashidova et al. // Eur. J. Biochem.—1986.—159, N 1.—P. 95—101.
17. Identification of 16S RNA fragment crosslinked to protein S1 within *E. coli* ribosomal 30S subunits by use of a cross-linking reagent — ethyl-4-azidobenzoylaminoaceti-

- midate / B. Golenska, R. Millon, C. Backendorf et al. // *Ibid.*—1981.—115, N 3.— P. 479—484.
18. *Cross-linking* between 16S ribosomal RNA and protein S4 in *Escherichia coli* ribosomal 30S subunits effected by treatment with bisulfite/hydrazine and bromopyruvate / N. Nitta, O. Kuge, S. Yui et al. // *Ibid.*—1986.—157, N 3.— P. 427—432.
19. Stöffler G., Stöffler-Meilicke M. Immuno electron microscopy on *Escherichia coli* ribosomes // Structure, function, and genetics of ribosomes / Eds B. Hardesty, G. Kramer.— New York: Springer, 1986.— P. 28—46.
20. *Ribosome* structure, function, and evolution: mapping ribosomal RNA, proteins, and functional sites in three dimensions / M. Oakes, E. Henderson, A. Scheinman et al. // *Ibid.*— P. 47—67.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отделения АН СССР,  
Новосибирск

Получено 03.05.88

rRNA-PROTEIN INTERACTIONS IN *ESCHERICHIA COLI* 70S RIBOSOMES  
AND IN COMPLEX OF INITIATION BY DATA OF CROSS-LINKS  
WITH BIFUNCTIONAL Pt(II) DERIVATIVE

P. G. Chistyakov, M. Abdulkarimov, A. G. Venyaminova, S. N. Vladimirov,  
D. M. Graifer, S. A. Kazakov, G. G. Karpova

Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

S u m m a r y

rRNA-protein cross-links in 70S <sup>35</sup>S-labelled ribosomes in the free state and within initiation complex ribosome·AUGU<sub>6</sub>·fMet-tRNA<sup>fMet</sup> were investigated using bifunctional cleavable reagent {dichloro[N,N,N',N'-tetrakis-(2-aminoethyl)-1,6-hexamethylenediamine-diplatinum(II)]}dichloride. The sets of proteins cross-linked to 16S and 23S rRNA in free 70S ribosomes and in 70S initiation complex were shown to slightly differ. It was found that one of L7/L12 dimers borders on one of 16S rRNA sites (a distance ≲1,5 nm) both in free ribosomes and in initiation complex.

УДК 547.963.3

Д. Б. Дорохов, В. Б. Одинцов, С. В. Кириллов

МАТРИЧНОЗАВИСИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АМИНОЦИЛ-ТРНК  
С А-УЧАСТКОМ 70S РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*  
В ОТСУТСТВИЕ ТРАНСПЕПТИДАЦИИ

Измерены константы ассоциации Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с А-участком 70S рибосом в условиях блокирования ее связывания с Р-участком деацелированной тРНК<sup>Phe</sup>. По зависимости величины константы ассоциации от температуры рассчитаны энтальпия ( $\Delta H^\circ \sim 11$  ккал/моль) и энтропия ( $\Delta S^\circ \sim -5$  кал·моль<sup>-1</sup>·град<sup>-1</sup>) этого взаимодействия. Константа ассоциации Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, измеренная при 0°C и блокировании Р-участка нерасцепляемым аналогом пептидил-тРНК, хорошо согласуется с этой зависимостью. Около двух ионов магния прямо или опосредованно принимают участие в матричнозависимом взаимодействии Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с А-участком 70S рибосом.

**Введение.** Получение количественных данных о взаимодействии аминоксил-тРНК с А-участком рибосомы представляет большой интерес, так как именно оно обеспечивает, по-видимому, точность отбора очередной аминоксилоты в процессе элонгации и, как следствие, высокую точность трансляции. Однако до настоящего времени не получено не только сравнительных физико-химических характеристик взаимодействия близких по кодовым свойствам аминоксил-тРНК с А-участком комплекса рибосома — матрица, но и не рассчитаны термодинамические параметры взаимодействия соответствующей кодону аминоксил-тРНК с А-участком в условиях равновесия. Трудность состоит в выборе системы для его измерения.

Ранее было показано, что Phe-тРНК<sup>Phe</sup> обладает ббльшим сродством к Р-участку комплекса [70S+поли(U)], чем к А-участку, и при