

УДК 547.963.3

БИОХИМИЯ

В. Г. БУДКЕР, А. С. ГИРШОВИЧ, Н. И. ГРИНЕВА, Г. Г. КАРПОВА,
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, Н. Д. КОБЕЦ

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ РИБОСОМ ВБЛИЗИ мРНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА

Недавно мы показали ⁽¹⁾, что направленная химическая модификация реакционноспособными аналогами субстратов («мечение по родству»), нашедшая широкое применение при исследовании активных центров ферментов, может быть использована и для направленной модификации сложных рибонуклеопротеидных частиц — рибосом. Используя аналог аминоксил-тРНК — хлорамбуцилил-С¹⁴-фенилаланил-тРНК, содержащий реакционноспособный остаток 2-хлорэтиламина, мы осуществили селективную модификацию рибосом в районе пептидилтрансферазного центра.

В настоящей работе сообщается о применении этого подхода для модификации другого функционального центра рибосомы — участка, ответственного за связывание мРНК. С этой целью мы изучили взаимодействие рибосомы с алкилирующим аналогом мРНК — 2',3'-О-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиден]-гептаденилил-аденозином (Ap)₇ACHRCI. Ранее было показано, что аналогичное производное тетраденилиладенозина (Ap)₄ACHRCI стимулирует связывание С¹⁴-лизил-тРНК с рибосомами в той же мере, что и немодифицированный (Ap)₄A ⁽²⁾ и обладает способностью эффективно алкилировать рРНК в комплементарном комплексе ⁽³⁾.

С¹⁴-(Ap)₇ACHRCI (5 мС/ммоль) получили аналогично ⁽⁴⁾, обрабатывая трифторуксусной кислотой при -70° 0,1 М раствор (Ap)₇A в диметилформамиде, содержащем 0,6 М С¹⁴-4-(хлорэтилметиламино)-бензальдегид и 0,5 М диметоксипропан. Выдержав 45 мин. при 20°, смесь нейтрализовали триэтиламино при -70° и осадили эфиром. После переосаждения из метанола в эфир получили препарат, содержащий в нуклеотидном материале 93% (Ap)₇ACHRCI и 7% (Ap)₇A. Найдено: $\lambda_{\text{max}}^{\text{pH}7}$ 257 мμ; $\epsilon_{260}^{\text{pH}7}$ 131 · 10³ R, относительно рА в системе растворителей *n*-пропанол—аммиак—вода (55:10:35) 1,64. Рибосомы получали из *Escherichia coli* MRE-600, как описано ранее ⁽⁶⁾. Аминоацилирование тРНК С¹⁴L-лизином (удельная активность 100 мС/ммоль; производства ЧССР) проводили по стандартной методике ⁽⁷⁾. Комплекс рибосома — (Ap)₇ACHRCI — лизил-тРНК получали по Ниренбергу и Ледеру ⁽⁸⁾ и анализировали гельфильтрацией на Сефадексе Г-100, как описано в ⁽¹⁾.

(Ap)₇ACHRCI эффективно стимулирует связывание С¹⁴-лизил-тРНК с рибосомами (~85% от величины связывания в присутствии полпадениловой кислоты). Комплекс рибосома — С¹⁴(Ap)₇ACHRCI — тРНК после формирования во избежание неспецифического алкилирования отделяли от избытка С¹⁴(Ap)₇ACHRCI гельфильтрацией на Сефадексе Г-50. Модификацию рибосом в составе комплекса проводили 24 часа при 25°. Согласно ⁽⁹⁾, за это время реакционноспособным остается 27% реагента. Следует отметить, что в ходе реакции тройной комплекс частично диссоциирует (на ~20% за 24 часа), причем наблюдаемая устойчивость комплекса, вообще говоря, может быть несколько завышена, вследствие параллельно идущего процесса алкилирования рибосом. Появление свободного реагента, однако,

не может привести к сколько-нибудь заметной неспецифичной модификации вследствие очень низкой эффективности алкилирования такими реагентами вне комплекса ($\sim 2-3\%$) (²) по сравнению с эффективностью реакции в комплексе (³).

После проведения реакции для разрушения тройного комплекса рибосомы осаждали спиртом, растворяли в буфере с концентрацией Mg^{2+} 0,1 мМ и центрифугировали в сахарозном градиенте 5–20% при концентрации Mg^{2+} 0,5 мМ. При этом не присоединенный ковалентно к рибосомам $C^{14}(Ap)_7ACHRCI$ практически полностью отделяется от рибосомальных субъединиц (см. рис. 1а). Анализ степени модификации рибосом после инкубации в выбранных условиях демонстрирует высокую эффек-

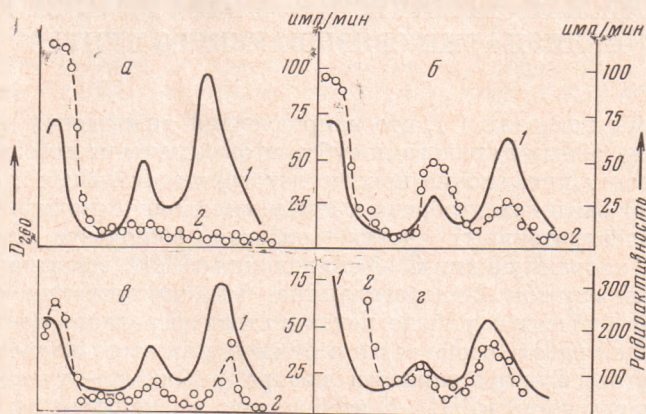


Рис. 1. Профиль оптической плотности (1) и радиоактивности (2) рибосом, модифицированных $(Ap)_7ACHRCI$ и $MerACHRCI$, при центрифугировании в градиенте сахарозы 5–20% после диализа против буфера с концентрацией Mg^{2+} 0,5 мМ. а — комплекс рибосома — $(Ap)_7ACHRCI$ — тРНК, разрушен сразу же после выделения, б — рибосомы, модифицированные в составе комплекса рибосома — $(Ap)_7ACHRCI$ — тРНК 24 часа, в — рибосомы, модифицированные $(Ap)_7ACHRCI$ после преобразования комплекса рибосома — полиА — тРНК, г — рибосомы, модифицированные $MerACHRCI$

тивность алкилирования: за 24 часа примерно 30–40% реагента, находящегося в комплексе, ковалентно связывается с рибосомами.

Модификацию рРНК, выделенной из алкилированных рибосом, определяли после разрушения связи алкилирующей группировки реагента с его олигонуклеотидным звеном, обрабатывая рРНК при pH 4 (¹⁰). Следует отметить, что 4-(хлорэтилметиламино)-бензальдегид не образует нековалентных связей с рРНК (³). Модификацию белка определяли по содержанию радиоактивности в кислотонерастворимой фракции после гидролиза алкилированных рибосом в 5% трихлоруксусной кислоте при 90° 15 мин. Оказалось, что $(Ap)_7ACHRCI$ в основном реагирует с рРНК в рибосоме (см. табл. 1). Резкое различие в распределении модификации между рРНК и белком для реакций с $MerACHRCI$ (⁴) и $(Ap)_7ACHRCI$ свидетельствует о существенном влиянии олигонуклеотидной части на направление химической реакции.

На рис. 1б показано распределение радиоактивности между рибосомальными субъединицами. Видно, что модифицированы обе субъединицы, причем малая субъединица алкилируется значительно эффективнее в отличие от реакции с модельным соединением $MerACHRCI$ (рис. 1). Полученные результаты коррелируют, вообще говоря, с известным представлением о локализации мРНК-связывающего центра на 30S-субъединице. Модификация 50S-субъединицы в эксперименте еще не указывает на наличие неспецифического комплексобразования и последующей реакции. Соглас-

но распространенному представлению, мРНК-связывающий центр, локализованный на 30S-субъединице, расположен на ее поверхности, контактирующей с 50S-субъединицей. В этом случае имеется потенциальная возможность алкилирования участков 50S, обращенных к мРНК-связывающему центру.

Свидетельством в пользу специфичности алкилирования мРНК-связывающего центра (Ap)₇ACHRCI мог бы служить, по нашему мнению, ингибирующий эффект полиадениловой кислоты, являющейся нормальной матрицей при образовании тройного комплекса с рибосомами в присутствии лизиновой тРНК. В этом эксперименте (Ap)₇ACHRCI добавляли к рибосомам после предынкубации последних с тРНК и 4-кратным против (Ap)₇ACHRCI избытком полиадениловой кислоты. Поскольку кажется маловероятным вытеснение полиадениловой кислоты из тройного комплекса олигонуклеотидом, естественно было предположить, что любой комплекс реагента с рибосомами в этих условиях, а следовательно, модификация последних, должен быть неспецифическим. Результаты представлены на рис. 1в. Видно, что предынкубация с полиадениловой кислотой мало сказывается на степени алкилирования 50S-субъединицы, в то же время наблюдается резкое падение модификации 30S-субъединицы. Полученный результат убеждает в том, что (Ap)₇ACHRCI в значительной степени идет специфично вблизи мРНК-связывающего центра. Модификация же 50S, по всей видимости, является следствием образования неспецифического комплекса (Ap)₇ACHRCI с одним или несколькими участками его поверхности. Этот неспецифический процесс, однако, не препятствует выявлению рибосомальных компонентов, находящихся в (или вблизи) мРНК-связывающего центра на 30S-субъединице.

Если (Ap)₇ACHRCI ковалентно присоединяется к рибосомам вблизи мРНК-связывающего центра, то такие модифицированные рибосомы могут обладать способностью связывать лизил-тРНК без добавления соответствующей матрицы. Для проверки этого предположения тройной комплекс после модификации разрушали, как описано выше, и рибосомы отделяли от тРНК и не присоединенного химически реагента гельфильтрацией на колонке с Сефадексом Г-100 уравновешенным буфером с концентрацией Mg²⁺ 0,5 мМ. Выделяемые таким образом рибосомы проверяли на способность связывать С¹⁴-лизил-тРНК в отсутствие и в присутствии поли-А.

В качестве контроля аналогичная процедура была проведена с рибосомами, обработанными (Ap)₇ACHRCI, предварительно инкубированным с β-меркаптоэтанолом в условиях исчерпывающего превращения реагента в неактивную форму. Второй контроль — рибосомы, модификация которых ингибировалась предварительным добавлением поли-А, как описано выше. Результаты опыта приведены в табл. 2. Можно видеть, что действительно модифицированные (Ap)₇ACHRCI рибосомы приобрели некоторую способность связывать С¹⁴-лизил-тРНК без добавления поли-А. Этот результат безусловно, свидетельствует в пользу того, что (Ap)₇ACHRCI модифицирует рибосомы в районе мРНК-связывающего центра. Более того, такая ко-

Таблица 1

Реагент	Количество реагента в комплексе (М/М 70S рибосомы)	Относительная модификация 30S/50S	Относительная модификация рРНК/белок в 70S
Мер ACHRCI	—	0,56	0,37
(Ap) ₇ ACHRCI	4,1	2,3	8,0

Таблица 2

Вариант	Рибосомы, обработанные (Ap) ₇ ACHRCI имп/мин	Рибосомы, обработанные (Ap) ₇ ACHRCI в присутствии избытка поли-А имп/мин	Рибосомы, обработанные (Ap) ₇ ACHRCI, предварительно инкубированной с β-меркаптоэтанолом имп/мин
В присутствии поли-А	665	630	627
Без поли-А	283	57	28

валентная фиксация октаадениловой кислоты не препятствует функционированию последней в качестве матрицы при связывании рибосомой ли-зил-тРНК.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
26 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. S. Bochkareva, V. G. Budker et al., FEBS Letters, 19, № 2, 121 (1971), В. Г. Будкер, А. С. Гиршович, Л. М. Скобельщина, ДАН, 207, 215 (1972); Е. С. Бочкарева, В. Г. Будкер и др., Мол. биол., 7, № 2, 278 (1973). ² В. Г. Будкер, Д. Г. Кнорре, С. Н. Яснова, Мол. биол., 4, 581 (1972). ³ Н. И. Гринцева, Г. Г. Карпова, Изв. АН СССР, сер. хим., 1972, 2377. ⁴ Г. И. Барам, С. И. Беликов и др., Изв. СО АН СССР, сер. хим., № 1, 119 (1972). ⁵ M. W. Nirenberg, H. Matthaei, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 1598 (1961). ⁶ Л. С. Сандахчиев, В. К. Старостина и др., Мол. биол., 1, 463 (1967). ⁷ Д. Г. Кнорре, В. И. Сиротюк, Л. Е. Стефанович, Мол. биол., 1, 837 (1967). ⁸ M. W. Nirenberg, P. Leder, Science, 145, 1399 (1964). ⁹ В. В. Власов, Н. И. Гринцева, Д. Г. Кнорре, Изв. СО АН СССР, сер. хим., № 2, в. 1, 104 (1969). ¹⁰ В. В. Власов, Н. И. Гринцева и др., Мол. биол., 4, 201 (1970).