



УДК 577.217.347/348:577.217.52

ИССЛЕДОВАНИЕ мРНК-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ОБЛАСТИ РИБОСОМЫ  
НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ТРАНСЛЯЦИИI. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНАЛОГОВ мРНК — AUGU<sub>6</sub>  
И ЕГО БЕНЗИЛИДЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ — В РИБОСОМНОЗАВИСИМОМ  
БЕЛКОВОМ СИНТЕЗЕ*Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г.**Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР**Берзинь В. А., Грен Э. Я., Циелене И. Э.**Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига**Веньяминова А. Г., Репкова М. Н., Ямковой В. И.**Новосибирский государственный университет*

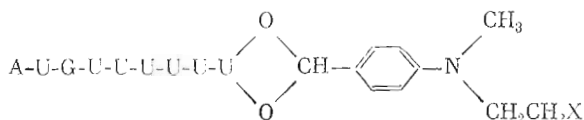
Осуществлен катализируемый РНК-лигазой синтез нонарибонуклеотида AUGU<sub>6</sub>, содержащего кодон инициации на 5'-конце молекулы, из гексарибоурцидиловой кислоты, полученной гидролизом poly(U) эндонуклеазой из яда кобры, и химически синтезированного триэфирным методом тринуклеотида AUG. Введением 2',3'-O-{4-[N-(2-хлор-(или окс)этил)-N-метиламино]}бензилиденового остатка на 3'-конец олигонуклеотида AUGU<sub>6</sub> получены его бензилиденные производные AUGU<sub>6</sub>CHRCI и AUGU<sub>6</sub>CHRON. Изучена матричная активность синтезированных аналогов мРНК в образовании 70S комплекса инициации. Показано, что AUGU<sub>6</sub>, AUGU<sub>6</sub>CHRON и AUGU<sub>6</sub>CHRCI стимулируют факторзависимое связывание fMet-tРНК с рибосомами. Исследовано влияние бензилиденового фрагмента на матричную активность AUGU<sub>6</sub>CHRON в процессе трансляции. Найдено, что AUGU<sub>6</sub>CHRON стимулирует синтез ди- и трипептидов с той же эффективностью, что и AUGU<sub>6</sub>.

Ранее было показано, что 2',3'-O-{4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]}бензилиденные производные олигонуклеотидов (начиная с пентануклеотидов) стимулируют связывание аминоктил-tРНК с рибосомой [1]. Применение таких производных олигоурцидилатов разной длины (от пента- до октаурцидилатов) в качестве аналогов матрицы позволило систематически исследовать мРНК-связывающую область рибосомы *E. coli* вблизи А-участка декодирующего района в условиях неэизиматического связывания tРНК<sup>Phe</sup> с рибосомой [2, 3].

Однако из-за неоднозначности посадки oligo(U) на рибосоме при образовании тройного комплекса рибосома-oligo(U)<sub>1</sub>-tРНК<sup>Phe</sup>, а также из-за различной длины подвижной нефиксированной кодон-антикодоновым взаимодействием части реагента набор белков, подвергающихся химической атаке этими аналогами мРНК, зависел от длины олигонуклеотидного фрагмента. Для однозначной посадки матрицы на рибосоме при образовании комплекса казалось разумным использовать бензилиденные производные олигоурцидилатов, содержащие на 5'-конце иницирующий триплет AUG. С помощью такого типа реагентов удобно изучать компоненты рибосом, контактирующие с матрицей на разных этапах трансляции.

Использованы следующие сокращения: OCHRCI — 4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензальдегид, OCHRON — 4-[N-(2-оксизэтил)-N-метиламино]бензальдегид, >CH<sub>2</sub>OEt — этоксиметилен, ClPh — *n*-хлорфенил, Tri — триазол-1-ил, DMAP — 4-диметилпиперидин, Thr — тетрагидропиранил, fMet — N-формилметнионин. Остальные сокращения соответствуют общепринятым.

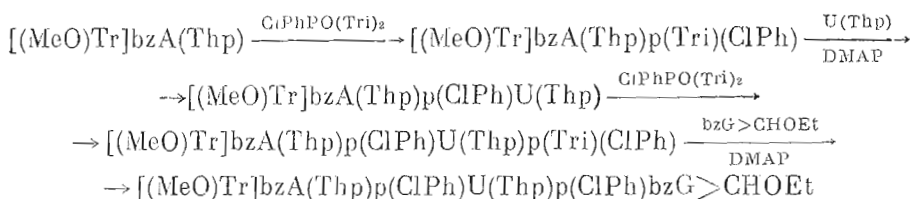
В настоящей работе были синтезированы аналоги мРНК — аденилил-уридилилгуанилилгексауридилат ( $AUGU_6$ ), его 2',3'-O-{4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]}бензилиденное производное ( $AUGU_6CHRCI$ ) и не-реакционноспособный аналог последнего 2',3'-O-{4-[N-(2-оксиэтил)-N-метиламино]}бензилиденное производное ( $AUGU_6CHRON$ ), исследована их способность образовывать 70S комплекс инициации в присутствии fMet-тРНК и факторов инициации и функциональная активность на различных этапах трансляции:



( $AUGU_6CHRX$ ), где X — OH или Cl.

Аденилил (3'→5') уридил (3'→5') гуанозин (AUG) синтезировали триэфирным методом с помощью бифункционального фосфорилирующего агента — *n*-хлорфенилфосфодитриазолида — и 4-диметиламинопиридина в качестве нуклеофильного катализатора. Данный вариант триэфирного метода синтеза был успешно использован ранее при синтезе дезоксирибонуклеотидов [4].

Синтез вели по следующей схеме:



Необходимые для синтеза защищенные производные уридина, аденозина и гуанозина были получены известными методами [5–10]. После удаления защитных групп с полностью защищенного тринуклеозиддифосфата и фракционирования реакционной смеси на QAE-сефадексе А-25 получен хроматографически чистый продукт, нуклеотидный состав которого доказывали гидролизом смесью фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры. Отсутствие примеси тринуклеозиддифосфата с неприродными связями было доказано гидролизом РНКазой T<sub>2</sub>.

Аденилилуридилгуанилилгексауридилат ( $AUGU_6$ ) в количестве около 300 ОЕ<sub>260</sub> синтезировали из AUG и гексауридилата с помощью РНК-лигазы, выделенной по методу [11]. Данный метод выделения фермента позволяет получить значительное количество фермента с хорошей степенью чистоты. Доступность РНК-лигазы, пригодной для целей олиго-рибонуклеотидного синтеза, позволила нам осуществить в настоящей работе синтез  $AUGU_6$  в масштабе, превышающем в 5 раз масштаб препаративного синтеза, осуществленного нами ранее [12]. Выход целевого продукта при этом не уменьшился.

Олигонуклеотид  $AUGU_6$  превращали в  $AUGU_6[^{14}C]CHRCI$  или в  $AUGU_6CHRON$  обработкой  $O[^{14}C]CHRCI$  или  $OCHRON$  соответственно в присутствии 2,2-диметоксипропана и трифторуксусной кислоты как описано в работе [13].

Содержание  $AUGU_6[^{14}C]CHRCI$  и  $AUGU_6CHRON$  в препаратах, полученных после осаждения реакционной смеси эфиром, составляет 95,6 и 100% соответственно.

Матричную активность AUG,  $AUGU_6$  и его производных изучали при 37° С по стимулированию связывания fMet-тРНК рибосомой в 70S комплексе инициации в присутствии факторов инициации. Результаты анализа матричной активности AUG,  $AUGU_6$ ,  $AUGU_6CHRON$  и  $AUGU_6CHRCI$  методом осаждения 70S комплекса инициации на фильтрах (табл. 1) свидетельствуют, что матричная активность  $AUGU_6CHRON$ ,  $AUGU_6CHRCI$  и  $AUGU_6$  в 1,3–2,0 раза ниже, чем для AUG. Некоторое снижение матричной активности в образовании комплекса инициации ранее наблюдали

Стимулирование связывания  $f[^3\text{H}]$  Met-тРНК с рибосомами матричными олигонуклеотидами  
По данным фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры

Матрица, пмоль	$f[^3\text{H}]$ Met-тРНК (пмоль), связанная в присутствии			
	AUG	AUGU <sub>6</sub>	AUGU <sub>6</sub> CHRON	AUGU <sub>6</sub> CHRCI
0,5	8,5	4,5	4,2	4,3
1,0	9,9	5,5	5,4	5,2
1,5	10,3	6,5	—	5,7
2,0	10,7	7,0	6,5	6,2
3,0	11,3	8,2	—	7,8

*Примечание.* В каждом опыте использовали 82,5 пмоль рибосом и 40—70 пмоль  $f[^3\text{H}]$ Met-тРНК. Связывание  $f[^3\text{H}]$ Met-тРНК в отсутствие матрицы составляет 2,2 пмоль на 82,5 пмоль рибосом.

Таблица 2

Образование иницирующего 70S рибосомного комплекса в присутствии различных матричных олигонуклеотидов  
По данным центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы

Матрица	Матрица, пмоль	$f[^3\text{H}]$ Met-тРНК	Связывание матрицы, пмоль	Связывание $f[^3\text{H}]$ Met-тРНК, пмоль *
AUGU <sub>6</sub>	630	+		9,7
	—	+		0,9
AUGU <sub>6</sub> CHRON	740	+		8,8
	—	+		0,9
AUGU <sub>6</sub> [ <sup>14</sup> C]CHRCI	740	+		9,0
	—	+		1,0
AUGU <sub>6</sub> [ <sup>14</sup> C]CHRCI	640	+	12	
	640	—	1,1	

\* В каждом опыте использовали 82,5 пмоль рибосом и 40—70 пмоль  $f[^3\text{H}]$ Met-тРНК.

Таблица 3

Продукты трансляции (приведено количество, пмоль)  
AUGU<sub>6</sub> и AUGU<sub>6</sub>CHRON в бесклеточной системе

Матрица	fMet-Phe	fMet-Phe-Phe
AUGU <sub>6</sub>	7,8	15,4
AUGU <sub>6</sub> CHRON	7,4	16,3

Ганоца и др. [14] при переходе от AUG к гексануклеотидам AUGUUU, AUGUUA, AUGUAA.

Комплексы инициации, образованные в присутствии AUGU<sub>6</sub> и AUGU<sub>6</sub>CHRON, довольно устойчивы при 37° С. Как видно из рис. 1, за 1 ч при 37° С диссоциирует не более 35—40% комплекса. Такая сравнительно высокая стабильность комплекса инициации при этих условиях открывает возможность использования AUGU<sub>6</sub>CHRCI для аффинной модификации рибосом в области мРНК-связывающего центра на стадии инициации трансляции.

Комплекс инициации 70S·fMet-тРНК·AUGU<sub>6</sub>CHRCI легко может быть выделен центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (10—40%). На рис. 2 приведены профили седиментации комплексов инициации, полученных в присутствии  $f[^3\text{H}]$ Met-тРНК на матрицах AUGU<sub>6</sub>, AUGU<sub>6</sub>CHRCI и AUGU<sub>6</sub>CHRON. Последующий анализ поглоще-

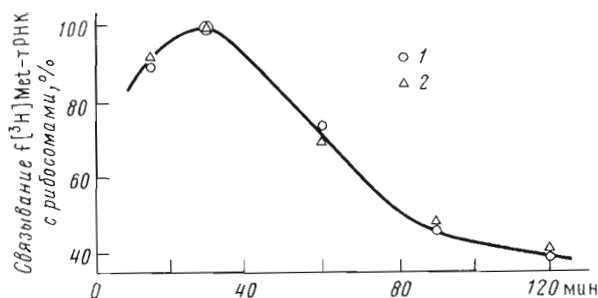


Рис. 1. Диссоциация при 37°С комплексов инициации 70S·f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК·AUGU<sub>6</sub> (1) и 70S·f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК·AUGU<sub>6</sub>·CHRON (2)

ния и радиоактивности фракций, соответствующих 70S комплексу инициации, показал, что использование 8–9-кратного избытка AUGU<sub>6</sub>, AUGU<sub>6</sub>CHRCI или AUGU<sub>6</sub>CHRON по отношению к рибосомам приводит к связыванию около 0,12 моль fMet-тРНК на 1 моль рибосом (табл. 2). В случае AUGU<sub>6</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI связывание матрицы с рибосомой в 70S комплекс составляет 0,15 моль на 1 моль рибосомы. В отсутствие инициаторной fMet-тРНК эффективность связывания AUGU<sub>6</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI с рибосомой снижается на порядок (табл. 2).

Следует отметить, что результаты определения матричной активности AUGU<sub>6</sub> и его бензилиденовых производных с помощью таких различных методов, как осаждение комплекса инициации на фильтрах и ультрацентрифугирование в линейном градиенте концентрации сахарозы, несколько различаются (ср. табл. 1 и 2). По нашему мнению, метод определения матричной активности аналогов мРНК с помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы более достоверен и надежен, так как во время центрифугирования при 4°С в течение 4 ч комплекс практически не диссоциирует и, кроме того, судя по опыту с AUGU<sub>6</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI, не связавшийся в комплекс олигомер количественно отделяется (рис. 2).

Ранее было показано, что присутствие 2',3'-O-{4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]}бензилиденовой группы на 3'-конце олигонуклеотида изменяет конформацию связанного с ней нуклеозида и нарушает его стекинг-взаимодействие со следующим нуклеозидным остатком [15, 16]. Справедливо было считать, что вследствие такого конформационного искажения ближайший к бензилиденовому фрагменту нуклеотидный остаток становится неспособным к комплементарному взаимодействию с антикодонном тРНК. Возможно, по этой причине заметное стимулирование EF-Tu-независимого связывания кодонспецифичной аминоксил-тРНК с рибосомой бензилиденовыми производными наблюдалось, начиная с пептануклеотидов [1]. На основании этого можно было ожидать, что матрица AUGU<sub>6</sub>, содержащая бензилиденовый фрагмент на 3'-конце, не способна стимулировать синтез fMet-Phe-Phe.

Для изучения влияния бензилиденового фрагмента на матричную активность олигонуклеотида на различных стадиях трансляции мы использовали нереагирующее производное AUG — AUGU<sub>6</sub>CHRON, чтобы избежать алкилирования рибосом в процессе биосинтеза.

Из результатов анализа продуктов трансляции AUGU<sub>6</sub>CHRON в бесклеточной системе биосинтеза белка (табл. 3) видно, что вопреки ожидаемому основным продуктом AUGU<sub>6</sub>CHRON-направляемого синтеза является fMet-Phe-Phe (70%), причем количество ди- и трипептидов, образующихся при трансляции AUGU<sub>6</sub>CHRON, такое же, как и при трансляции AUGU<sub>6</sub>. Это значит, что бензилиденовый фрагмент, присоединенный к 3'-концу AUGU<sub>6</sub>, практически не влияет на способность олигомера стимулировать синтез fMet-Phe-Phe.

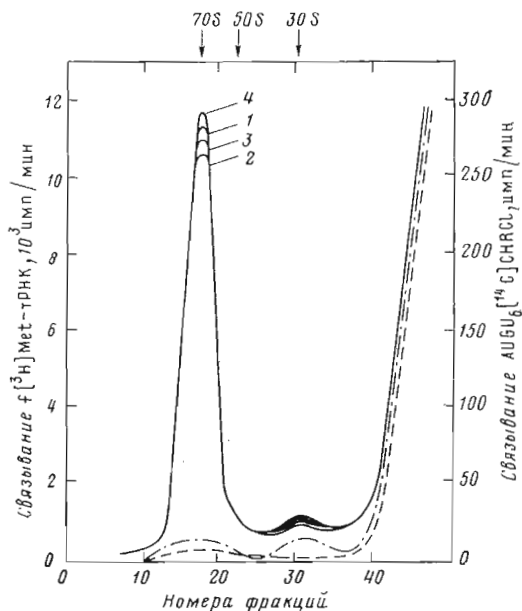


Рис. 2. Профили седиментации комплексов инициации 70S·f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК·AUGU<sub>6</sub> (1), 70S·f[<sup>3</sup>H]Met - тРНК·AUGU<sub>6</sub>·СНRОН (2), 70S·f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК·AUGU<sub>6</sub>СНRСI (3), 70S·fMet - тРНК·AUGU<sub>6</sub>[<sup>14</sup>C]СН·RСI (4) при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы (10–40%). Сплошная линия — полная система инициации, штриховая — в отсутствие матрицы, штрихпунктирная — в отсутствие f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК

На основании полученных данных можно предположить, что либо 3'-концевой триплет AUGU<sub>6</sub>СНRОН становится полноценным кодоном вследствие частичного исправления конформации 3'-концевого нуклеотидного остатка матрицы в процессе трансляции, либо для EF-Tu-зависимого связывания аминоксил-тРНК в А-участке рибосомы достаточно динуклеотидного кодон-антикодонного взаимодействия.

### Экспериментальная часть

В работе использовали уридин (Sigma, США; Reanal, Венгрия), аденозин (Sigma, США; Союзреактив), гуанозин (Союзреактив); АТР, GTP, полиуридиловую кислоту и тРНК *E. coli* MRE-600 производства СКТЬ БАВ (Новосибирск); [<sup>14</sup>C]фенилаланил с удельной радиоактивностью 360 мКи/ммоль (ЧССР), [<sup>3</sup>H]метионин с удельной радиоактивностью 15 Ки/ммоль (Amersham, Англия), [<sup>3</sup>H]гуанозин-5'-дифосфат с удельной радиоактивностью 13 Ки/ммоль отечественного производства; дитиотреит (Koch Light, Англия); трис (Serva, ФРГ); альбумин из сыворотки крови человека (Serva, ФРГ); лейковорин SF (кальциевая соль *Citrovorum Faktor*) фирмы Serva (ФРГ); РНКазу T<sub>2</sub> (КФ 3.1.27.1, Sankyo Co, Япония); фосфоенолпироват (Reanal, Венгрия), пируваткиназу (КФ 2.7.1.40) с активностью 660 ед. акт./мл (концентрация белка 2,1 мг/мл) производства Calbiochem (Швейцария); глицерин (ч.д.а., отечественного производства), триазол (Sigma, США), ионообменные смолы дауэкс 50В (Serva, ФРГ), QAE-сефадек А-25 (Pharmacia, Швеция). Для адсорбционной хроматографии использовали силикагель марки Kieselgel 60 (Merck, ФРГ). Хроматографию проводили на бумаге FN-11 (ГДР), ТСХ — на пластинках Silufol UV-254 (ЧССР) и DC-Al Kieselgel 60 F-254 (Merck, ФРГ) в системах растворителей: *n*-бутанол (насыщенный аммиаком) — этилацетат, 4:1 (А); метанол — хлороформ, 1:9 (Б); ацетонитрил — вода, 4:1 (В).

Гексарибоуридиловую кислоту, содержащую фосфат на 5'-конце молекулы, получали гидролизом полиуридиловой кислоты эндонуклеазой из яда кобры *Naja naja oxiana* (КФ 3.1.27), как описано в работе [47].

Эндонуклеазу из яда кобры (*Naja naja oxiana*) выделяли по методу [18].

РНК-лигазу (КФ 6.5.1.3) выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом Т4am82, по методу, описанному нами ранее [11]. Полученный препарат фермента (концентрация РНК-лигазы 43,4 мкМ,

концентрация белка 8,4 мг/мл) содержал не более 1 ед. акт. 3'-экзонуклеазы на 1 пмоль РНК-лигазы [19].

*Аденилил(3'→5')уридиллил(3'→5')гуанозин.* а) [(MeO)Tr]bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp). К 120 мг (1,74 ммоль) триазола в 2,3 мл абс.диоксана добавляли при перемешивании 0,09 мл (0,55 ммоль) *n*-хлорфенилфосфодихлоридата. К полученной смеси по каплям добавляли 0,15 мл (1,08 ммоль) триэтиламина в 0,3 мл абс.диоксана. Через 30–45 мин выпавший осадок триэтиламмонийхлорида отфильтровывали. В фильтрате — 0,2 М раствор *n*-хлорфенилфосфодитриазолида. 255 мг (0,32 ммоль) [(MeO)Tr]bzA(Thp) растворяли в 2,1 мл абс.пиридина и добавляли 2,1 мл (0,42 ммоль) полученного как описано выше 0,2 М раствора *n*-хлорфенилфосфодитриазолида. Через 30 мин реакция фосфорилирования проходила до конца (контроль — ТСХ, система Б).

К полученному раствору добавляли 42,7 мг (0,35 ммоль) DMAP и 163 мг (0,5 ммоль) U(Thp) и выдерживали 2 ч при 20° С. Затем реакционную смесь разлагали добавлением равного объема 1 М ТЕАВ (рН 7,5), экстрагировали хлороформом (3×10 мл) и объединенные слои упаривали с добавлением толуола и этанола до удаления пиридина. Остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с силикагелем (30 мл). Элюцию веществ вели хлороформом, содержащим последовательно 0, 1, 2, 3, 4% метанола. Фракции, содержащие вещество с  $R_f$  0,5 (ТСХ, система Б) и  $R_f$  0,73 (ТСХ, система В), объединяли, упаривали и вещество выделяли осаждением из хлороформа абсолютным петролеинным эфиром. Получили 300 мг (70%) [(MeO)Tr]bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp).

б) [(MeO)Tr]bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp)p(ClPh)bzG>CHOEt. 253 мг (0,2 ммоль) [(MeO)Tr]bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp) растворяли в 1,2 мл абс.пиридина и добавляли 1,2 мл (0,24 ммоль) предварительно приготовленного 0,2 М раствора *n*-хлорфенилфосфодитриазолида в абс.диоксане. Через 1 ч к реакционной смеси добавляли 2,4 мг (0,2 ммоль) DMAP и 133 мг (0,3 ммоль) bzG>CHOEt и выдерживали 2 ч при 20° С. К раствору добавляли 0,6 мл (0,1 ммоль) 0,2 М раствора *n*-хлорфенилфосфодитриазолида в абс.диоксане и через 30 мин разлагали реакционную смесь равным объемом 1 М ТЕАВ (рН 7,5). После экстракции хлороформом (3×10 мл) и упаривания объединенных органических слоев с толуолом и этанолом до удаления пиридина остаток растворяли в хлороформе и наносили на колонку с силикагелем (30 мл). Элюцию веществ вели хлороформом, содержащим последовательно 0, 1, 2, 3, 4% метанола. Фракции, содержащие вещество с  $R_f$  0,48 (ТСХ, система Б) и  $R_f$  0,67 (ТСХ, система В), упаривали и переосаждали из сухого хлороформа в абс.петролеинный эфир. Получили 219 мг (59%) [(MeO)Tr]bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp)p(ClPh)bzG>CHOEt.

в) *Аденилилуридиллилгуанозин (AUG)*. 100 мг (0,05 ммоль) [(MeO)Tr]bzA(Thp)p(ClPh)U(Thp)p(ClPh)bzG>CHOEt растворяли в 11 мл смеси пиридин — концентрированный аммиак (1:10, по объему) и выдерживали 6 сут при 20° С. Затем раствор упаривали, к остатку добавляли 10 мл 0,01 М HCl и выдерживали 2 ч при 50° С. Полученный раствор нейтрализовали конц. NH<sub>4</sub>OH и экстрагировали эфиром. Водный слой наносили на колонку (2×20 см) с QAE-сефадексом А-25 в HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-форме. Элюцию вели со скоростью 50 мл/ч 2 л раствора бикарбоната аммония, рН 7,8 (линейный градиент концентрации от 0 до 0,6 М). Фракции основного пика объединяли и упаривали несколько раз с добавлением воды для удаления бикарбоната аммония, после чего лиофилизовали. Выход AUG — 19 мг (40%).

Полученный тринуклеозиддифосфат был гомогенен по данным микроколоночной хроматографии на сорбенте Nucleosil C-18 (Macheray Nagel, ФРГ). Его нуклеотидный состав доказывали гидролизом смесью фосфодиэстеразы и 5'-нуклеотидазы из яда кобры (НГУ) в 0,02 М трис-HCl, содержащем 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (рН 7,8), при 20° С в течение 12 ч. Анализ гидролизата методом микроколоночной хроматографии на сорбенте Nucleosil C-18 показал соотношение А — U — G = 1,1 : 1 : 1,2. Строение тринуклеозиддифосфата было подтверждено полным гидролизом РНКазой T<sub>2</sub> в 0,01 М

CH<sub>3</sub>COONa, содержащем 0,4 мМ EDTA (рН 4,5), при 20° С в течение 12 ч. Анализ гидролизата на сорбенте Nucleosil C-18 дал соотношения А — Ур — G=1 : 1,1 : 1,1.

*Нонануклеозидоктафосфат AUGU<sub>6</sub>*. Взаимодействие AUG с гексарибонуридиловой кислотой в присутствии РНК-лигазы проводили в объеме 10 мл по методу, описанному нами ранее [12]. Выделение AUGU<sub>6</sub> и доказательство его строения проводили как описано в работе [12]. Выход целевого продукта после обессоливания и лиофилизации 27%.

*AUGU<sub>6</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI и AUGU<sub>6</sub>CHRON* получали как описано в работе [13], обрабатывая при -70° С трифторуксусной кислотой 6 мМ раствор цетавлоновой соли олигонуклеотида в диметилформамиде, содержащий 0,6 М О [<sup>14</sup>C]CHRCI или OCHRON и 0,5 М диметоксипропан. Реакционную смесь выдерживали 45 мин при 20° С, нейтрализовали при -70° С триэтил-амином, осаждали эфиром. Полученные продукты растворяли в метаноле и осаждали эфиром. Пересаживание повторяли трижды. Затем осадки растворяли в диметилформамиде, переводили в натриевую соль добавлением 1 М NaI в ацетоне и осаждали ацетоном. Соотношение AUGU<sub>6</sub>—OCHRCI и AUGU<sub>6</sub>—OCHRON в полученных препаратах определяли спектрофотометрически после гидролиза бензилиденовой связи при рН 2 и температуре 20° С, как в работах [20, 21].

*f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК* получали аминоацилированием суммарной тРНК (с уд. акт. препарата fMet 7,5 Ки/ммоль), используя супернатантную фракцию S100 как источник активирующих ферментов и лейковорин как донор формильных групп [22]. Конечный продукт имел обычно 15—25 пмоль [<sup>3</sup>H]метгониона на 1 ОЕ<sub>260</sub> тРНК.

*Рибосомы*, свободные от примесей РНКаз, получали по методу [23].

*Иницирующие факторы, IF1, IF2, IF3* получали как описано в работе [22]. Активность компонентов системы инициации трансляции определяли по связыванию инициаторной f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК с рибосомами в присутствии как нативных матриц (MS2-РНК, frРНК) (данные не приведены), так и синтетических. Рибосомный комплекс инициации фиксировали на нитроцеллюлозных фильтрах в соответствии с работой [24].

Факторы элонгации EF-Tu·Ts и EF-G выделяли способом, описанным в работах [25, 26]. Активность EF-Tu определяли по связыванию белка с [<sup>3</sup>H]GDP и последующей фильтрацией комплекса EF-Tu·[<sup>3</sup>H]GDP на нитроцеллюлозных фильтрах [26]. Активность фактора EF-G определяли по стимуляции синтеза [<sup>14</sup>C]полифенилаланина в бесклеточной системе в присутствии фактора EF-Tu [26].

*Фенилаланил-тРНК-синтаза* (КФ 6.1.1.20) 86%-ной чистоты, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, любезно предоставлена С. Н. Ходыревой и В. Н. Анкиловой.

*Аминоацилирование тРНК [<sup>14</sup>C]фенилаланином* и определение ее степени аминоацилирования проводили как указано в работе [27].

*Рибосомный комплекс инициации* получали в 100 мкл буфера (50 мМ трис-НСI, рН 7,4; 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит), содержащего 0,2 мМ GTP, 3,3 ОЕ<sub>260</sub> (82,5 пмоль) рибосом, 2,8 ОЕ<sub>260</sub> тРНК (40—70 пмоль f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК), 2,3 ОЕ<sub>260</sub> (86 пмоль) MS2-РНК или 0,5—3 пмоль синтетических матриц (AUG, AUGU<sub>6</sub>, AUGU<sub>6</sub>CHRCI, AUGU<sub>6</sub>CHRON), 0,7 мкг фактора IF1, 1,1 мкг фактора IF2, 0,9 мкг фактора IF3. После инкубации в течение 10 мин при 37° С реакционную смесь разбавляли 1,5 мл холодного буфера, содержащего 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, немедленно фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр, промывали 4 мл того же буфера и высушивали. Радиоактивность считали в толуольном сцинтилляторе на счетчике Packard Tricarb (модель 3380, США) или Mark-3 (Nuclear Chicago, США).

В некоторых экспериментах 70S комплексы инициации анализировали центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы 10—40% (Spinco L5-65 (США), ротор SW-56; 40 000 об/мин, 4 ч, 4° С). Реакционная смесь в 100 мкл буфера (50 мМ трис-НСI, рН 7,4; 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит) содержала 0,2 мМ GTP, 3,3 ОЕ<sub>260</sub> (82,5 пмоль) рибосом, 2,8 ОЕ<sub>260</sub> тРНК (40—70 пмоль f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК) и

0,63 нмоль AUGU<sub>6</sub> или AUGU<sub>6</sub>CHRON или 0,74 нмоль AUGU<sub>6</sub>CHRCI, 0,7 мкг фактора IF1, 1,1 мкг фактора IF2, 0,9 мкг фактора IF3. При получении иницирующего комплекса 70S рибосом с радиоактивной матрицей и нерадиоактивной fMet-тРНК реакционная смесь содержала 1280 пмоль AUGU<sub>6</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI, 6,6 ОЕ<sub>260</sub> (160 пмоль) рибосом и соответствующие количества остальных компонентов. По окончании центрифугирования содержимое пробирок фракционировали по 100 мкл и измеряли оптическую плотность и радиоактивность каждой фракции.

Тройной комплекс [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК·EF·Tu·GTP получали в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСI (рН 7,5), 150 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 6 ОЕ<sub>260</sub> тРНК, содержащей [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК, 0,3 ОЕ<sub>260</sub> GTP, 1000 пмоль EF·Tu·Ts. Смесь инкубировали 10 мин при 0° С.

Для синтеза олигопептидов в бесклеточной системе сначала получали рибосомный комплекс инициации в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреит, 0,2 мМ GTP, 1,5 ОЕ<sub>260</sub> (37,5 пмоль) рибосом, 1,4 ОЕ<sub>260</sub> тРНК (21–35 пмоль f[<sup>3</sup>H]Met-тРНК), 4 нмоль олигонуклеотида (AUGU<sub>6</sub> или AUGU<sub>6</sub>CHRON), 1,1 мкг фактора IF2, 0,9 мкг фактора IF3. Реакционную смесь инкубировали 10 мин при 37° С, затем охлаждали до 0° С. К инициаторному комплексу добавляли предварительно полученный (как описано выше) тройной комплекс [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК·EF·Tu·GTP и инкубировали 10 мин при 0° С. К реакционной смеси в объеме 100 мкл добавляли 25 мкг фактора EF-G и 0,3 ОЕ<sub>260</sub> GTP. Смесь инкубировали 60 мин при 25° С, затем охлаждали до 0° С.

Продукты реакции анализировали после обработки реакционной смеси равным объемом 0,5 н. NaOH в течение 10 мин при 37° С. После нейтрализации 0,5 н. HCl реакционную смесь наносили на хроматографическую бумагу FN-11 (ГДР). На хроматограмму наносили также заведомые образцы fMet (любезно предоставлены В. В. Самуковым) и Phe. Хроматографию проводили при 20° С в системе А в течение 15 ч. На высушенной хроматограмме полосы fMet и Phe проявляли пингидрином, предварительно опрыскивая полосу fMet 0,1 н. HCl при нагревании (для удаления формильной группы). Полосы с образцами разрезали на отрезки 0,5×2 см от старта до фронта. <sup>14</sup>C- и <sup>3</sup>H-радиоактивность бумажных полосок измеряли в толщольном сцинтиллаторе в режиме счета образцов с двойной меткой. Радиоактивные пятна с R<sub>fMet</sub>, равными 1 и 1,9, совпадающие по положению на хроматограмме с fMet и Phe, содержали <sup>3</sup>H- и <sup>14</sup>C-метку соответственно и были отнесены к f[<sup>3</sup>H]Met и [<sup>14</sup>C]Phe. Пятна с R<sub>fMet</sub>, равными 2,7 и 3,8, содержали как <sup>3</sup>H-, так и <sup>14</sup>C-метку. Идентификацию веществ с R<sub>fMet</sub> 2,7 и 3,8 проводили по соотношению количества <sup>14</sup>C- и <sup>3</sup>H-радиоактивности в пятне с учетом удельной радиоактивности f[<sup>3</sup>H]Met и [<sup>14</sup>C]Phe, измеренной в этом же режиме. Вещества с R<sub>fMet</sub>, равными 2,7 и 3,8, содержали остатки f[<sup>3</sup>H]Met и [<sup>14</sup>C]Phe в соотношении 1,0:1,1 и 1,0:2,1 соответственно и были отнесены к fMet-Phe и fMet-Phe-Phe.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бюдкер В. Г., Кнорре Д. Г., Яснова С. Н. Молекулярн. биология, 1972, т. 6, № 4, с. 581–585.
2. Бюдкер В. Г., Кобец Н. Д., Коллекционер Н. Е., Карнова Г. Г., Гринева Н. И. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 3, с. 507–515.
3. Gimauldinova O. I., Karпова G. G., Knorre D. G., Kobetz N. D. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 14, p. 3465–3481.
4. Добрынин В. И., Быстров И. С., Чернов Б. К., Северцова И. В., Колосов М. Н. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 8, с. 1254–1256.
5. Gregoire R. J., Neilson T. Can. J. Chem., 1978, v. 56, № 4, p. 487–490.
6. Griffin B. E., Jarman M., Reese C. B. Tetrahedron, 1968, v. 24, № 2, p. 639–662.
7. Neilson T., Werstiuik E. S. Can. J. Chem., 1971, v. 49, № 3, p. 493–499.
8. Smrt J., Malkievicz A. Coll. Czech. Chem. Communs, 1973, v. 38, № 10, p. 2962–2975.
9. Zemlička J., Chládek S., Holý A., Smrt J. Coll. Czech. Chem. Communs, 1966, v. 31, № 8, p. 3198–3212.
10. Chládek S., Smrt J. Coll. Czech. Chem. Communs, 1964, v. 29, № 1, p. 214–233.
11. А. с. 910762 (СССР). Способ получения РНК-лигазы. Ямковой В. И., Веньяминова А. Г., Василецко С. К., Печасев Ю. С., Бакланов М. М., Чистяков П. П., Овощенко А. И. Опубл. в Б. И., 1982, № 9.



12. Веньяминова А. И., Франк Л. А., Ямковой В. И. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 1, с. 98—102.
13. Будкер В. Г., Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Кобец Н. Д., Теплова Н. М. Молекулярн. биология, 1976, т. 10, № 8, с. 340—355.
14. Galoza M. S., Fraser A. R., Neilson T. Biochemistry, 1978, v. 17, № 14, p. 2769—2775.
15. Беликова А. М., Гринева И. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. И., Кнорре Д. Г. Докл. АН СССР, 1970, т. 195, № 6, с. 1337—1340.
16. Гринева И. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. И., Кнорре Д. Г., Козоровицкий А. Я. Докл. АН СССР, 1971, т. 198, № 3, с. 158—162.
17. Василенко С. К., Сербю Н. А., Веньяминова А. Г., Болдырева Л. Г., Будкер В. Г., Кобец Н. Д. Биохимия, 1976, т. 41, вып. 2, с. 260—263.
18. Василенко С. К., Райт В. К. Биохимия, 1975, т. 40, вып. 3, с. 578—583.
19. Василенко С. К., Веньяминова А. Г., Ямковой В. И., Майоров В. И. Биорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 621—627.
20. Гринева И. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Ж. общ. химии, 1970, т. 40, вып. 1, с. 215—222.
21. Гринева И. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Изв. Сиб. отд. АН СССР, Сер. хим. наук, 1970, т. 4, вып. 2, с. 111—118.
22. Berzin V., Borisova G. F., Cielens I., Gribanov V. A., Jansone I., Rosenthal G., Gren E. J. J. Mol. Biol., 1978, v. 119, № 1, p. 101—131.
23. Циеленс И. Э., Розенталь Г. Ф., Берзинь В. М., Грен Э. Я. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 9, с. 1640—1645.
24. Nirenberg M. W., Leder P. Science, 1964, v. 145, № 3639, p. 1399—1401.
25. Arai K.-I., Kawakita M., Kaziro Y. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 21, p. 7029—7037.
26. Kaziro Y., Inoue-Yokosawa N., Katakita M. J. Biochem., 1972, v. 72, № 4, p. 853—863.
27. Кнорре Д. Г., Сиротюк В. И., Стефанович Л. Е. Молекулярн. биология, 1967, т. 1, № 6, с. 837—843.

Поступила в редакцию

25.11.1983

После доработки

4.V.1983

## STUDIES ON mRNA-BINDING REGION OF RIBOSOMES AT DIFFERENT STAGES OF TRANSLATION. I. FUNCTIONAL ACTIVITY OF mRNA ANALOGS — AUGU<sub>6</sub> AND ITS BENZYLIDENE DERIVATIVES IN PROTEIN BIOSYNTHESIS

BAVKINA G. T., KARPOVA G. G., BERSIN V. A., GREN E. J.,  
CIELENS I. E., VENJAMINOVA A. G., REPKOVA M. N., YAMKOVY V. I

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk; Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga; Novosibirsk State University, Novosibirsk*

Hexaribouridylic acid, prepared by digestion of poly(U) with cobra venom endonuclease, and trinucleotide AUG synthesized chemically by triester approach were joined by RNA-ligase to yield a nonaribonucleotide AUGU<sub>6</sub> bearing the initiation codon at its 5'-terminus. 2',3'-O-{4-[N-(2-chloro(or hydroxy)ethyl-N-methylamino)]-benzylidene} residues were introduced at the 3'-terminus of oligonucleotide AUGU<sub>6</sub> and its benzylidene derivatives AUGU<sub>6</sub>CHRCI or AUGU<sub>6</sub>CHROH were obtained. The mRNA analogs synthesized were tested for their template activity in the formation of 70S initiation complex. AUGU<sub>6</sub>, AUGU<sub>6</sub>CHRCI and AUGU<sub>6</sub>CHROH were shown to stimulate factor-dependent binding of fMet-tRNA to ribosomes. The effect of benzylidene fragment on the template activity of AUGU<sub>6</sub>CHROH in the course of translation process was studied. It was shown that AUGU<sub>6</sub>CHROH stimulates synthesis of di- and tripeptides with the same efficiency as AUGU<sub>6</sub>.