



УДК 577.113.4 : 577.152.312*64

© 1990 г.

М. А. Зенкова, Г. Г. Карпова, А. С. Левина,
С. В. Мамаров, В. В. Соловьев *

КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ 16S рРНК
ESCHERICHIA COLI 2',3'-O-[4-N-МЕТИЛ-N-(2-ХЛОРЕТИЛ)-
АМИНОБЕНЗИЛИДЕНОВЫМИ] ПРОИЗВОДНЫМИ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
IV*. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УЧАСТКОВ СВЯЗЫВАНИЯ 16S рРНК
С БЕНЗИЛИДЕНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ d(pACCTTGTT)rA,
d(pTTACGACT)rU, d(TTTGCTCCCC)rA

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР;

*Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Впервые с помощью гибридизации фрагментов 16S рРНК, полученных в результате гидролиза РНК с помощью РНКазы Н в составе ковалентных аддуктов (продуктов сайт-направленной модификации 16S рРНК 2',3'-O-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)аминобензилиденовыми] производными олигодезоксирибонуклеотидов d(pACCTTGTT)rA, d(pTTACGACT)rU, d(pTTTGCTCCCC)rA — реагентов (II)—(IV) соответственно), с фрагментами рестрикции плазмиды рКК 3535, содержащей полный оперон *rrnB* рРНК *E. coli*, были определены все участки взаимодействия реагентов (II)—(IV) с 16S рРНК. Обнаружено соответствие между расчетной стабильностью несовершенного гетеродуплекса 16S рРНК-олигонуклеотид и относительной степенью модификации 16S рРНК по данному участку алкилирующим производным этого олигонуклеотида. Показано, что при проведении сайт-направленного алкилирования при высоких концентрациях реагентов ($(2-3) \cdot 10^{-3}$ М) кроме алкилирования по выбранному участку, которое является основным, происходит модификация РНК в составе ряда несовершенных комплексов. В большей степени модифицируются участки 16S рРНК, образующие несовершенные гетеродуплексы с реагентом, в которых в комплексе с РНК находится один из концов олигонуклеотидного адреса реагента. Обсуждается влияние вторичной структуры 16S рРНК на сайт-направленную модификацию.

Основной принцип взаимодействия нуклеиновых кислот — принцип комплементарности — положен в основу подхода для направленной модификации нуклеиновых кислот, предложенного Н. И. Гриневой и названного комплементарно адресованной модификацией [2]. При использовании в качестве матрицы отдельных олигодезоксирибонуклеотидов или одноцепочечных фрагментов ДНК с маловыраженной пространственной структурой наблюдалось высокоселективное алкилирование нуклеотидных остатков только вблизи участков связывания реагента, образующих с ним совершенные комплексы [3—5]. Данные по локализации точек модификации тРНК с использованием $>\text{CH}_2\text{RCl}$ и ClRCH_2NH -производных олигонуклеотидов [6], а также полученные нами ранее данные по комплементарно адресованной модификации 16S рРНК [1, 7] указывают на то, что наряду с алкилированием по выбранным участкам рРНК происходит модификация в составе комплексов, в которых не все основания реагента образуют комплементарные пары с основаниями матрицы. По-видимому, несовершенная комплементационная точность характерна для сайт-направ-

* Сообщение III см. [1]. Сокращения: $>\text{CH}_2\text{RCl}$ — 2',3'-O-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)аминобензилиденовые] производные; ClRCH_2NH — [4-N-метил-N-(2-хлорэтил)-аминобензил]-5'-фосфамидо-; SDS — додецилсульфат натрия.

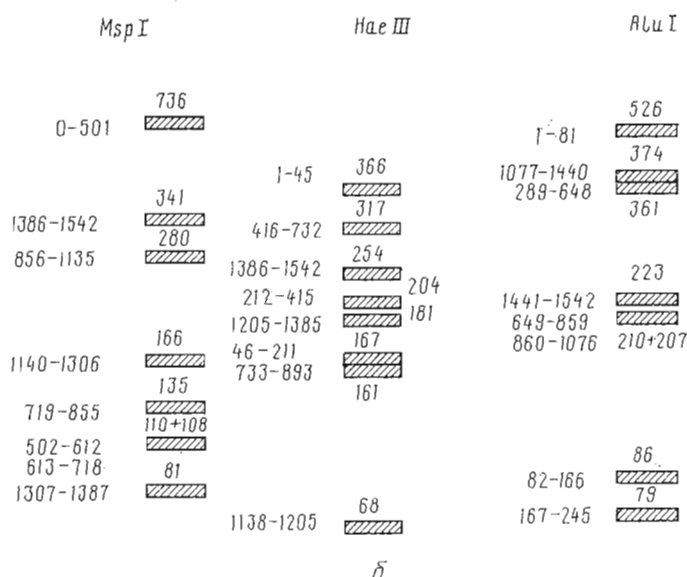
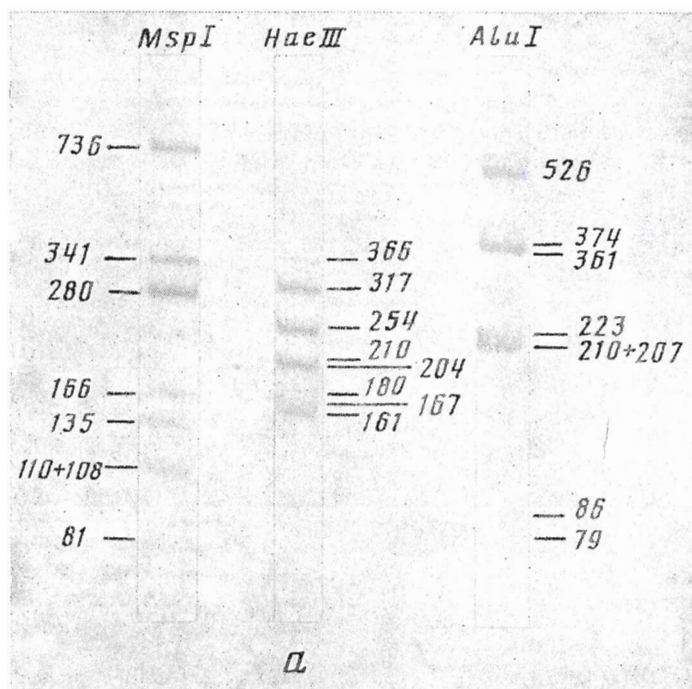


Рис. 1. Определение положения на фильтре фрагментов рестрикции рДНК, содержащих участки 16S рРНК. *а* — блот-гибридизация фрагментов рестрикции рДНК со смесью ^{32}P -меченых фрагментов 16S рРНК, получающихся в результате ограниченного щелочного гидролиза 16S рРНК; ^{32}P -метка вводилась после щелочного гидролиза реакцией кинирования. Цифрами указаны размеры фрагментов в парах оснований; *б* — схематическое изображение расположения фрагментов рестрикции на фильтре; цифрами указаны размеры фрагмента (над фрагментом) и участок 16S рРНК, соответствующий этому фрагменту (слева)

ленной модификации нуклеиновых кислот, обладающих достаточно сложной пространственной организацией.

В настоящей работе с помощью метода блот-гибридизации проведена идентификация всех участков 16S рРНК, взаимодействующих с бензилиденновыми производными олигонуклеотидов d(pACCTTGTT)гA, d(pTTACGACT)гU, d(pTTTGCTCCCC)гA — реагентов (II)–(IV) соответственно; оценены относительные стабильности несовершенных гетеродуп-

А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А
А	Н	М	А	Н	А	М	А	Н	М	А	Н	А

лексов; показана возможность использования теоретических подходов [8, 9] для предсказания вероятных участков связывания РНК с адресованным реагентом.

Идентификацию участков алкилирования 16S рРНК реагентами (II)—(IV) проводили с помощью гибридизации фрагментов 16S рРНК, полученных в результате гидролиза РНК с помощью РНКазы Н в составе ковалентных аддуктов (продуктов сайт-направленной модификации 16S рРНК реагентами (II)—(IV)), с фрагментами рестрикции плазмиды рКК 3535, содержащей полный оперон *rrnB* рРНК *E. coli*.

Алкилирование 16S рРНК (концентрация $1,0 \cdot 10^{-6}$ М) при 20° С при использовании 20-кратных мольных избытков реагентов (II) и (IV) и 30-кратного избытка реагента (III) по отношению к РНК, согласно [1, 7], происходит на предельную глубину. При этом в этих условиях модификация протекает как в совершенном комплексе, так и в несовершенных гетеродуплексах. Образовавшиеся в результате алкилирования ковалентные аддукты отделяли от избытка реагента с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы в присутствии 1% SDS, как описано в работе [10]. Выделенный ковалентный аддукт гидролизовали РНКазой Н. В используемых нами условиях происходит количественное расщепление цепи 16S рРНК в составе ковалентных аддуктов [1, 11]. По 3'-ОН-группам образовавшихся фрагментов 16S рРНК вводили 32 P-метку с помощью [32 P]рСр и Т4-РНК-лигазы. Полученную таким образом смесь [32 P]фрагментов 16S рРНК использовали далее для идентификации сайтов разрезания РНКазой Н с помощью блот-гибридизации с фрагментами рестрикции рДНК.

Фрагмент *Bam*HI—*Xba*I длиной 3240 п. о., включающий в себя полную последовательность 16S рРНК, был вырезан из плазмиды рКК 3535, содержащей полный оперон *rrnB* рибосомных РНК *E. coli* [12]. Выделенный фрагмент *Bam*HI—*Xba*I гидролизовали в параллельных экспериментах тремя мелкощепляющими рестриктазами: *Msp*I, *Hae*III, *Alu*I. Образовавшиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК известного размера разделяли электрофорезом в 4% ПААГ и переносили на капроновый фильтр. Для однозначного определения положения на фильтре всех фрагментов рестрикции, содержащих участки 16S рРНК, фрагменты рДНК на каждом фильтре гибридовали с 32 P-меченым щелочным гидролизатом 16S рРНК (рис. 1а). Отнесение сигналов гибридизации проводили, сопоставляя размеры гибридизующихся фрагментов ДНК с картой рестрикции фрагмента *Bam*HI—*Xba*I и последовательностью 16S рРНК (рис. 1б).

На рис. 2а—б показаны радиоавтограммы фильтров после гибридизации со смесью 32 P-меченых фрагментов 16S рРНК и обработки их с помощью РНКазы А. После такой обработки связанными с фрагментами ДНК на фильтре остаются только те части меченых фрагментов РНК, которые полностью защищены комплексообразованием. Обнаружение радиоактивной метки в месте, соответствующем какому-либо определенному фрагменту рестрикции, свидетельствует о положении участка связывания РНК с реагентом внутри участка РНК, соответствующего данному фрагменту рестрикции.

В качестве контроля приведены радиоавтограммы фильтров после гибридизации с 32 P-мечеными ковалентными аддуктами (16S рРНК)—(II), (16S рРНК)—(III), (16S рРНК)—(IV), не гидролизованными РНКазой Н. Необходимость такого контроля обусловлена тем, что в процессе алкилирования 16S рРНК, а также выделения и ферментативных обработок ковалентных аддуктов может происходить неспецифическая деградация 16S

Рис. 2. Радиоавтограммы фильтров с иммобилизованными фрагментами рестрикции рДНК после гибридизации со смесью 32 P-меченых фрагментов 16S рРНК, образующихся в результате гидролиза цепи РНК с помощью РНКазы Н в составе ковалентных аддуктов с реагентами (II) (а; $\alpha = 0,95$), (III) (б; $\alpha = 1,60$), (IV) (в; $\alpha = 1,25$). 32 P-Метка вводилась после гидролиза РНКазой Н по 3'-ОН-группам образовавшихся фрагментов РНК (опыт), контроль (К) — ковалентные аддукты (16S рРНК) — (II), (16S рРНК)—(III), (16S рРНК)—(IV) не подвергались гидролизу РНКазой Н. М — *Msp*I-, Н — *Hae*III-, А — *Alu*I-рестрикты; α — число остатков реагента, моль/моль РНК

pРНК, сопровождающаяся образованием дополнительных фрагментов, содержащих 3'-ОН-группы внутри данного участка, не связаных с сайт-направленной модификацией РНК. В контроле при отсутствии неспецифической деградации 16S pРНК должна наблюдаться гибридизация ^{32}P -меченых ковалентных аддуктов с фрагментами рестрикции рДНК, соответствующими 3'-концевой части молекулы РНК. Это фрагменты длиной 341 (*Msp*I), 254 (*Hae*III) и 223 п. о. (*Alu*I). Гибридизация этих фрагментов наблюдается в контроле для ковалентного аддукта (16S pРНК)—(III) (рис. 2б). В ковалентных аддуктах (16S pРНК)—(II) и (16S pРНК)—(IV) в процессе всех обработок произошло повреждение 3'-конца 16S pРНК, что привело к исчезновению в контрольном эксперименте полос, соответствующих гибридизации 3'-концевого участка 16S pРНК с соответствующими фрагментами рестрикции (рис. 2а, в). Кроме того, в контрольном эксперименте в случае всех трех реагентов происходит гибридизация РНК с фрагментами рестрикции, содержащими последовательность, соответствующую участку 16S pРНК 46—80 (рис. 2).

Радиоавтограммы фильтров, представленных на рис. 2а—б, сканировали с помощью лазерного сканера и определяли распределение радиоактивной метки между фрагментами на каждой дорожке (скане). Ввиду того что эффективность переноса на капроновую мембрану зависит от длины фрагмента [13] и короткие фрагменты в отличие от длинных в условиях гибридизации образуют менее прочные комплексы с ^{32}P -меченым зондом, мы ввели параметр I_j^* — относительную интенсивность сигнала гибридизации j -фрагмента рестрикции рДНК:

$$I_j^* = \frac{\ln I_j}{I_j},$$

где I_j — интенсивность сигнала гибридизации j -фрагмента ДНК, равная площади пика j -фрагмента на скане, выраженная в процентах от общей площади пиков на скане данной дорожки (фрагменты, гибридизующиеся и в опыте, и в контроле, не учитывались); l_j — длина j -фрагмента. Введение параметра I_j^* в такой форме объясняется тем, что $I_j^* \sim Kx_j = \exp(-\Delta G_j/RT)$, где только ΔG_j зависит от длины j -фрагмента l_j . Данные отнесения сигналов гибридизации и сканирования приведены на рис. 3а—в для реагентов (IV), (II), (III) соответственно.

Как видно из рис. 3а—в, модификация 16S pРНК реагентами (II)—(IV) происходит по нескольким участкам для каждого из реагентов. С помощью блот-гибридизации ^{32}P -меченых фрагментов РНК с фрагментами рестрикции рДНК удалось определить как положение сайтов связывания реагентов с 16S pРНК с точностью приблизительно до 100 нуклеотидов, так и относительную степень модификации 16S pРНК по каждому из участков (I_j^*). Для реагента (IV) на долю гибридизации, соответствующей алкилированию РНК по выбранному участку в совершенном комплексе (771—781), приходится не менее 20% суммарной ^{32}P -метки во фрагментах РНК. Причем наиболее короткий фрагмент *Msp*I-рестрикции длиной 135 п. о., включающий в себя эту область, имеет максимальное значение $I_j^* = 20,7$. Кроме того, выявлены еще три участка прочного связывания реагента (IV) с 16S pРНК (416—502 ($I_j^* = 10$), 613—718 ($I_j^* = 11$), 856—900 ($I_j^* = 14$ —15)) и ряд слабых комплексов в областях 16S pРНК (82—166, 167—245, 930—1076, 1140—1306, 1383—1542; значение I_j^* для этих участков находится в области 5—9 единиц).

На рис. 3б приведены результаты определения участков 16S pРНК, взаимодействующих с реагентом (II). Ввиду того что реагент (II) комплементарен 3'-концевой последовательности РНК 1497—1505, с помощью гибридизации не удалось точно определить степень связывания реагента (II) с выбранным участком, так как 3'-конец 16S pРНК в ковалентном аддукте оказался поврежденным. Тем не менее гибридизация, соответствующая модификации по выбранному участку, является основной. В независимых экспериментах [1] с помощью прямого секвенирования по методу [14] основных фрагментов 16S pРНК, образующихся в результате гидролиза ковалентного аддукта (16S pРНК)—(II) РНКазой Н, было показано,

Определение участков 16S рРНК, образующих комплексы с реагентом (IV) ($d(pTTTTGCTCCCC)_nA > CHRCI$): сопоставление данных контекстного анализа; теоретической оценки стабильности гетеродуплексов по программе «Energy» (ΔG_j) и по методу [8] ($-\lg K_H/K_C$) с экспериментальными результатами

Участки 16S рРНК *	Последовательность 16S рРНК **	ΔG_j	$-\lg K_H/K_C$	Интенсивность сигнала гибридизации **
110—120	GGGUGAGUAAU	-14,40	7,38	
143—153	GGGGGAUAAACU	-16,50	8,71	
199—209	GGGGGACCUUC	-16,50	7,80	+
357—367	UGGGGAAUAUU	-18,60	7,10	++
373—383	AUGGGCGCAAG	-15,90	4,78	++
442—452	CGGGGAGGAAG	-19,10	3,58	+++
450—460	AAGGGAGUAAA	-17,20	5,10	(++)
537—547	GAGGGUGCAAG	-17,40	6,63	
565—573	CUGGGCGUAAA	-12,40	8,12	
663—673	AGGGGGGUAGA	-19,20	8,13	+++
706—716	UCUGGAGGAAU	-9,50	7,98	
(771—781)	UGGGGAGCAAA	-29,50	0	+++++
883—893	UGGGGAGUACG	-22,30	4,1	++++
940—950	GGUGGAGCAUG	-15,40	5,95	++
1182—1192	UGGGGAUGACG	-18,60	8,36	++
1265—1275	GCGAGAGCAAG	-12,10	6,40	
1351—1361	CGUGGAUCAGA	-8,00	9,48	
1419—1429	UGGUUUGCAAA	-18,40	6,05	++
1450—1460	UCGGGAGGGCG	-15,40	8,57	
1484—1494	AGGGGAACCUG	-16,50	7,46	++

* Скобками выделен участок 16S рРНК, образующий с реагентом совершенный комплекс; штриховой линией подчеркнуты участки 16S рРНК, в составе которых происходит алкилирование РНК.

** Подчеркнуты основания, образующие уотсон-криковские пары с реагентом; точкой отмечены возможные G-U-пары.

*** ++ — относительная интенсивность сигнала гибридизации, соответствующая взаимодействию реагента с каждым конкретным участком 16S рРНК; (+) — недостаточно экспериментальных данных для однозначной идентификации данного сайта (подробно см. текст).

Реагент (III), так же как и (II), образует совершенный комплекс с 3'-концом 16S рРНК (1491—1499). Поскольку фрагменты РНК, содержащие 3'-концевую последовательность, гибридизуются и в опыте, и в контроле, с помощью данного метода не удастся получить информацию о модификации 16S рРНК в совершенном комплексе с реагентом (III). Участки 16S рРНК 1—45, 162—211, 416—501, 502—612, 649—718, 719—855, 856—893, 927—1077, 1078—1137, 1206—1385, идентифицированные с помощью гибридизации, представляют собой модификацию в несовершенных гетеродуплексах. Таким образом, с помощью метода блот-гибридизации найдены области 16S рРНК с участками, образующими с реагентами (II)—(IV) как совершенные, так и несовершенные комплексы, в которых происходит сайт-направленная модификация 16S рРНК.

Для того чтобы более точно локализовать участки модификации 16S рРНК реагентами (II)—(IV) в несовершенных комплексах, был проведен поиск участков 16S рРНК, которые могут образовывать несовершенные комплексы с олигонуклеотидной частью реагентов (II)—(IV) внутри каждого из гибридизующихся фрагментов рестрикции с помощью программы контекстного анализа «Gomol» [15]. Учитывались все участки 16S рРНК, которые могут образовывать несовершенные гетеродуплексы, со-

Определение участков 16S рРНК, образующих комплексы с реагентом (II)
(p(dACCTTGT)TA > CHRCI)

Участки 16S рРНК *	Последовательность 16S рРНК **	ΔG_j	$-\lg K_H/K_C$	Интенсивность сигнала гибри- дизации **
67-77.....	UAACACAUG	-8,80	5,07	(++)
95-103	UGACGAGUG	-8,30	7,45	
149-157	UAACUACUG	-2,50	7,40	
193-201	CAAAGAGGC	-3,30	7,10	
324-332*	AGACACGGU	-10,1	4,02	++
368-376	GCACAAUGG	-4,40	6,0	
409-417*	GAAGAAGGC	-8,60	4,54	++
443-451*	UGGCAAGCU	-7,50	8,73	++
675-683	AUUCCAGGU	-5,80	5,95	
779-787	AAACAGGAU	-6,50	7,10	
813-821*	AAACGAUGU	-7,50	6,41	++
895-903*	CCGCAAGGU	-12,3	1,72	++
920-928	UGACGGGGG	-10,4	7,95	(+)
932-940	GCACAAAGCG	-9,50	4,40	+
972-980	GAAGAACCU	-2,20	8,40	
1099-1107	CAACGAGCG	-6,40	6,03	
1174-1182*	GAGGAAGGU	-10,20	5,90	++
1213-1221	CGACCACGG	-6,50	5,95	
1233-1241*	CUACAAUGG	-6,90	5,95	++
1428-1436*	AAAGAAGUA	-4,40	5,26	+
(1497-1505*)	UAACAAGGU	-17,40	0	++++

* Скобками выделен участок 16S рРНК, образующий с реагентом совершенный комплекс; штриховой линией подчеркнуты участки 16S рРНК, в составе которых происходит алкилирование РНК; знаком * отмечены открытые участки, звездочкой — участки, полностью занятые в образовании вторичной структуры РНК.
**, ** — см. примечание к табл. 1.

державшие не менее 5 (для реагента (IV) 6) нормальных уотсон-криковских пар. В сумме для молекулы 16S рРНК было выявлено 82 таких участка для реагента (II), 93 — для реагента (III) и 75 участков для реагента (IV). Затем по программе «Energy» [9] была оценена величина ΔG_j (изменение свободной энергии при образовании j -го несовершенного дуплекса). Эти значения ΔG_j (табл. 1—3) использовались далее только для сопоставления относительной стабильности гетеродуплексов, потому что использованные в программе «Energy» экспериментальные данные по изменению свободной энергии комплекса при образовании каждой комплементарной пары и образовании петель получены для рибо-олигомерных дуплексов, состоящих из гомоолигомеров [16, 17].

Сравнительно недавно в работе Перельройзена и Вологодского [8] был предложен теоретический метод оценки уровня модификации в несовершенных комплексах, основанный на статистической оценке равновесной термодинамической константы, который также позволяет оценить относительную стабильность несовершенных дуплексов. С помощью этого метода оценивается не абсолютное значение K_H (K — термодинамическая константа, индекс H — для несовершенного, C — для совершенного дуплексов), а отношение K_H/K_C по уравнению

$$\frac{K_H}{K_C} = \frac{1}{s_1 \cdot s_2 \cdot \dots \cdot s_{n-1} \cdot s_n} (s_j^* \cdot s_{j+1}^* \cdot \dots \cdot s_{j+k}^*),$$

$$s_{A \cdot T} = 9,2, \quad s_{G \cdot C} = 52,7; \quad s_j^* = \exp(-\Delta G_j^*/RT).$$

**Определение участков 16S рРНК, взаимодействующих с реагентом (III)
(p(dTTACGACT)rU>CHRCI)**

Все обозначения идентичны обозначениям, принятым в табл. 1, 2

Участки 16S рРНК *	Последовательность 16S рРНК **	ΔG_j	$-\lg K_H/K_C$	Интенсивность сигнала гибри- дизации **
58-66#	AAGUCCAAC	-10,3	3,95	++
159-167	AAACGGUAG	-3,1	10,1	
181-189	ACGUCGCAA	-7,40	5,66	+
354-362	CAGUGGGGA	-7,10	8,27	
422-430	GGGUUGUAA	-8,80	4,32	++
451-459	ACGGAGUAA	-5,20	7,91	
564-572	UGGGCGUAA	-8,10	4,69	++
655-663*	GUCUCGUAG	-8,50	3,61	++
727-735#	AAGGCGGCC	-4,40	5,66	+++
806-814	ACGCCGUAA	-5,50	6,80	
843-851	GAGGCGUGG	-7,70	5,66	
871-879*	AAGUCGACC	-9,80	2,89	++
1058-1066*	CUGUCGUCA	-8,50	4,99	+
1071-1079	GUGUUGUGA	-6,40	6,71	
1091-1099	AAGUCCCGC	-6,80	4,61	+
1161-1169	CAGUGAUAA	-5,40	7,31	
1291-1299	GCGUCGUAG	-11,40	4,61	++
1331-1339*	AAGUCGGAA	-10,70	2,76	+++
(1491-1499#)	AAGUCGUAA	-17,10	0	(++++)

Первый член произведения учитывает дестабилизацию совершенного комплекса за счет некомплементарных оснований на концах олигонуклеотидного адреса, а второй — дестабилизацию дуплекса при образовании неканонических пар: ΔG_j^* — дестабилизация дуплекса за счет образования неправильной пары вместо j -й канонической пары оснований. Значения $-\lg K_H/K_C$ также приведены в табл. 1—3; понятно, что, чем ближе данная величина к нулю, тем более стабилен несовершенный дуплекс.

Реагент (IV). С помощью программы контекстного анализа «Gomol» было обнаружено 75 участков в 16S рРНК, которые могут образовывать несовершенные комплексы различной стабильности с олигонуклеотидной частью реагента (IV). В табл. 1 включены 20 наиболее стабильных комплексов из 75, для которых значение ΔG_j оказалось минимальным. Как и ожидалось, минимальное значение ΔG_j имеет участок 16S рРНК 771—781, образующий совершенный комплекс с реагентом (IV). Кроме того, по оценке ΔG_j выявлены еще три сайта прочного связывания реагента (IV) с 16S рРНК (442—452, 663—673, 883—893), которые соответствуют основным сигналам гибридизации. Сопоставление экспериментальных данных, полученных с помощью гибридизации, и ΔG_j позволяет точно локализовать 13 комплексов (включая 771—781), в которых протекает модификация 16S рРНК реагентом (IV).

Для того чтобы оценить возможность использования метода [8] в предсказании наиболее стабильных несовершенных комплексов, для всех 75 дуплексов, найденных по программе «Gomol», было определено отношение K_H/K_C . Оказалось, что все участки, идентифицированные по совокупности данных гибридизации и значению ΔG_j как сайты взаимодействия с реагентом (IV), попадают в группу наиболее стабильных дуплексов в соответствии с величинами $-\lg K_H/K_C$.

При сопоставлении полученных результатов с моделью вторичной структуры 16S рРНК [18] было обнаружено, что все участки связывания

реагента (IV) (в том числе и 771—781) находятся в областях 16S рРНК, занятых в образовании вторичной структуры (петля+шпилька). Таким образом, независимо от вторичной структуры РНК (множественные короткие шпильки и петли) происходит связывание реагента (IV) с участками 16S рРНК, образующими с ним наиболее прочные комплексы, и алкилирование в этих комплексах.

Для взаимодействия реагента (IV) с 16S рРНК наблюдается только два несоответствия между экспериментальными данными и теоретической оценкой стабильности гетеродуплекса. Во-первых, это несоответствие, найденное для участка 663—673. По данным гибридизации, наблюдается сильный сигнал во фрагментах ДНК, включающих в себя этот участок. Найденное значение ΔG_j также указывает на существование стабильного дуплекса, тогда как $-\lg K_n/K_c$ равен 8,13. Это, по-видимому, связано с тем, что для оценки стабильности несовершенных комплексов по методу [8] недостаточно экспериментальных данных, учитывающих возможность стабилизации гетеродуплекса за счет образования неканонических $\text{rG} \cdot \text{dT}$ - или $\text{dG} \cdot \text{rU}$ -пар. Каждая такая пара вносит в ΔG дуплекса вклад порядка $-0,5 \div -1,0$ ккал/моль согласно данным работы [19]. Этот вклад учитывается при оценке ΔG по программе «Energy». Во-вторых, некоторые несоответствия наблюдаются для 5'-конца 16S рРНК: ни по энергии (ΔG_j), ни по отношению K_n/K_c в этой области не найдено достаточно стабильных комплексов между реагентом (IV) и 16S рРНК. Однако наблюдается довольно значительная гибридизация для двух фрагментов *AluI*-рестрикта: длиной 84 и 78 п.о. (эти фрагменты соответствуют участку 16S рРНК 82—166 и 167—244). Это связано, очевидно, с тем, что отнесение сигналов гибридизации и определение значения I_j^* для этого участка было проведено только по данным рестрикции *AluI*. Для рестриктов *MspI* и *HaeIII* эта область попадает во фрагменты длиной 736 и 167 п.о., которые гибридизуются и в опыте, и в контроле. И наконец, сопоставление экспериментальных данных по гибридизации и теоретических оценок стабильности дуплексов не позволяет сделать однозначный вывод, по какому участку (442—452 или 450—460) происходит алкилирование, так как они имеют близкие значения параметров ΔG_j и K_n/K_c .

Реагент (II). В табл. 2 приведены аналогичные данные для взаимодействия реагента (II) с 16S рРНК. Но в отличие от реагента (IV) только участок 895—903 образует достаточно прочный комплекс с реагентом (II) ($\Delta G = -12,4$ ккал/моль); остальные комплексы обладают примерно одинаковой стабильностью. Небольшие различия в интенсивности сигналов гибридизации для участка 16S рРНК 895—903 и участков 324—332, 813—821, 1174—1182, 1233—1241, 1428—1436, которые образуют значительно менее стабильные дуплексы с реагентом (II), объясняются тем, что эти участки, так же как и выбранный участок 1497—1505, не заняты в образовании вторичной структуры и более доступны для реагента (II), чем остальные, и 895—903 в частности. Как и в случае реагента (IV), для реагента (II) обнаружены anomalно высокие значения I_j^* для участков 82—166 и 167—244 (15,4 и 18,4 соответственно). Кроме того, некоторая неоднозначность наблюдается при идентификации сайтов связывания реагента (II) в области 16S рРНК 1206—1385. По оценкам ΔG_j и отношению K_n/K_c , в этом случае возможно образование трех несовершенных комплексов с реагентом (II) примерно одинаковой стабильности. Для реагента (II) кроме связывания и алкилирования по выбранному участку 1497—1505 (данные работы [1]) с помощью сопоставления данных по гибридизации и теоретических оценок выявлено связывание и алкилирование еще по крайней мере в семи несовершенных дуплексах.

Реагент (III). Сопоставление экспериментальных данных со значениями ΔG_j и $-\lg K_n/K_c$ (табл. 3) позволило идентифицировать следующие участки как сайты связывания реагента (III): 58—66, 181—189, 422—430, 564—572, 655—663, 727—735, 871—866, 1058—1066, 1091—1099, 1291—1299, 1331—1339. Наибольшее несоответствие интенсивности сигнала гибридизации (I_j^*) и относительной стабильности гетеродуплексов наблюдается для участков 727—735 ($-\lg K_n/K_c = 5,7$) и 871—

879 ($-\lg K_{\text{н}}/K_{\text{с}} = 2,9$). Это связано с тем, что участок 727—735 находится в петле, а 871—879 — в двуспиральной области согласно модели вторичной структуры 16S рРНК [18]. Кроме выбранного участка (1491—1499) и участка 727—735 в одноцепочечной области находятся фрагменты 16S рРНК — 1131—1339 и 58—66. Они алкилируются реагентом (III) в большей степени, чем участки 16S рРНК, образующие примерно такие же по стабильности несовершенные комплексы с реагентом, но находящиеся в двуспиральных областях 16S рРНК.

При внимательном рассмотрении несовершенных комплексов, приведенных в табл. 1—3, видно, что основной вклад в модификацию в несовершенных комплексах вносят гетеродуплексы, в которых неспаренные основания находятся на одном или обоих концах участка взаимодействия. На долю таких гетеродуплексов приходится 13 из 20 самых стабильных участков, приведенных в табл. 1 для реагента (IV). Полученные нами данные по влиянию вторичной структуры 16S рРНК на сайт-направленную модификацию для каждого из реагентов (II)—(IV) позволяют объяснить практически полное отсутствие модификации 16S рРНК реагентом (I) [7]. Реагент (I) полностью комплементарен 3'-концевой шпильке 16S рРНК, обладающей аномальной стабильностью [20]; все другие участки 16S рРНК, которые могут образовывать с реагентом (I) несовершенные комплексы, также в основном находятся в двуспиральных участках (данные не приводятся). Следовательно, отсутствие модификации 16S рРНК реагентом (I) — результат занятости участков РНК, полностью или частично комплементарных олигонуклеотидной части реагента (I), в формировании вторичной структуры молекулы 16S рРНК.

Таким образом, при проведении реакции сайт-направленной модификации при высоких концентрациях реагентов алкилирование по выбранному участку является основным (не менее 50% для реагента (II) и не менее 20% для реагента (IV)). Наряду с выбранным участком модификации подвергаются фрагменты, образующие с реагентом несовершенные комплексы, причем основной вклад вносит модификация в комплексах с неспаренными основаниями на концах. В случае, если все фрагменты РНК, способные образовывать комплексы с реагентом, равноценны по участию в формировании вторичной структуры молекулы, алкилирование происходит в составе наиболее стабильных гетеродуплексов. Если же фрагменты матрицы, образующие несовершенные комплексы с реагентом, не вовлечены в образование спиральных участков, т. е. открыты, алкилирование предпочтительно протекает по этим участкам. Участки РНК, полностью занятые в образовании вторичной структуры, значительно хуже вступают в реакцию сайт-направленной модификации, даже при возможности образования более прочного комплекса с реагентом. Теоретическая оценка относительной стабильности гетеродуплексов как по программе «Energy», так и по методу [8] хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными, что позволяет использовать оба этих метода для предсказания уровня модификации в несовершенных дуплексах.

Экспериментальная часть

В работе использовали 30S субчастицы рибосом *E. coli*, любезно предоставленные С. В. Кирилловым и В. И. Махно (ЛИЯФ); РНКазу *H. E. coli*, любезно предоставленную Н. В. Чичковой (МГУ, лаб. им. Белозерского), плазмиду рКК 3535 [18], любезно предоставленную Г. Ф. Ноллером; T4-РНК-лигазу (154 000 ед. акт./мл; НПО «Фермент», Вильнюс); РНКазу А (НПО «Биолар», Рига); рестриктазы *Xba*I, *Bam*HI, *Msp*I, *Hae*III, *Alu*I (НПО «Вектор», Кольцово); цитидин-[5'-³²P]-3',5'-дифосфат с уд. акт. >1 ПБк/моль отечественного производства; агарозу (Sigma, США); среды фирмы Gibco (Англия); капроновую мембрану (диаметр пор 0,2 мкм) производства экспериментальной лаборатории P/I «Хийу Калур» (Эстония); все остальные реактивы — препараты фирм Merck, Serva (ФРГ) и Fluka (Швейцария). Денситометрический профиль рентге-

новой пленки после радиоавтографии получали с помощью лазерного сканера Ultrascan (LKB, Швеция).

Синтез дезоксирибоолигонуклеотидов $d(pACCTTGTT)_{10}A$, $d(pT'ACGACT)_{10}U$, $d(pTTTGCTCCCC)_{10}A$, их бензилиденных производных — реагентов (II)—(IV) соответственно и характеристики реагентов приведены в работах [7, 10].

Выделение 16S рРНК, сайт-направленная модификация реагентами (II)—(IV) и выделение ковалентных аддуктов 16S рРНК с этими реагентами, а также гидролиз цепи РНК в составе ковалентных аддуктов с помощью РНКазы Н и введение ^{32}P -метки в получившуюся смесь фрагментов подробно описаны в работах [1, 10, 11]. Комплементарно адресованное алкилирование 16S рРНК проводили 90 ч при 20° С в буфере ТМК₃₅₀ (50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 20 мМ MgCl₂, 0,35 М KCl) при концентрации 16S рРНК $1 \cdot 10^{-6}$ М; [II] = $2 \cdot 10^{-5}$ М; [III] = $3 \cdot 10^{-5}$ М; [IV] = $2 \cdot 10^{-5}$ М. (Степень превращения реагентов в активную промежуточную частицу — этилениммониевый катион — составляла в этих условиях примерно 90%.) Были получены ковалентные аддукты (16S рРНК)—(II), (16S рРНК)—(III), (16S рРНК)—(IV) со степенями модификации равными 0,95; 1,60; 1,25 моль остатков реагента на 1 моль 16S рРНК соответственно.

Выделение плазмиды рКК 3535 и ее гидролиз ферментами рестрикции. ДНК плазмиды рКК 3535 трансформировали в клетки *E. coli* HB 101; трансформированные клетки выращивали на LB-среде в присутствии ампициллина, как описано в работе [21]. Плазмиду выделяли щелочным способом и очищали с помощью гель-фильтрации на сефарозе CL-4B. Фрагмент *Bam*HI—*Xba*I длиной 3240 п.о., образовавшийся в результате рестрикции плазмиды рКК 3535 рестриктазами *Bam*HI и *Xba*I, выделяли электрофорезом в 1% агарозе с последующей электроэлюцией на диализную мембрану. Выделенный фрагмент разделили на три порции и проводили рестрикцию *Msp*I, *Hae*III, *Alu*I. Получившиеся гидролизаты разделяли с помощью электрофореза в 10% ПААГ в нативных условиях (15 × 20 × 0,05 см), электрофорез проводили до выхода бромфенолового синего из геля. Фрагменты ДНК в геле окрашивали бромистым этидием и осуществляли электроперенос на капроновую мембрану в течение 30 мин (ток 0,5 А). Фрагменты ДНК иммобилизовали на мембране с помощью УФ-облучения.

Гибридизация. Фильтр с иммобилизованными на нем фрагментами ДНК прединкубировали согласно [22] 4—6 ч при 37° С в буфере следующего состава: 50% формамид, 10 мМ трис-НСl (рН 7,4), 1 мМ EDTA, 0,1% SDS, $5 \times \text{SSC}$ *, $4 \times \text{Денхардт}$ **, 10 мкг/мл денатурированная ДНК из спермы лосося, 0,1 мкг/мл poly(rA). Затем в течение 18 ч при 37° С в том же буфере проводили гибридизацию фильтра с 8 мкг смеси ^{32}P -меченых фрагментов 16S рРНК ((10—12) · 10⁶ имп/мин по Черенкову), получившихся в результате расщепления цепи РНК в составе ковалентного аддукта с реагентом (II), (III) или (IV), с помощью РНКазы Н. ^{32}P -Метку вводили в смесь фрагментов после гидролиза РНКазой Н. После гибридизации фильтр промывали при 37° С 2 раза по 15 мин в буфере, содержащем $2 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS, затем 2 раза по 15 мин в буфере состава $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS. Отмытый таким способом фильтр инкубировали 30 мин при 37° С с раствором РНКазы А (40 мкг/мл) в $2 \times \text{SSC}$, как описано в работе [23]. После инкубации с ферментом фильтр промывали так же, как и в первый раз. Влажный фильтр экспонировали при 0° С в течение 2—5 сут на рентгеновскую пленку РМБ-1 с усиливающим экраном.

Авторы выражают благодарность О. С. Федоровой и Е. М. Ивановой (НИБХ СО АН СССР) за большую помощь в обсуждении полученных результатов.

* $1 \times \text{SSC}$: 0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия.

** $1 \times \text{Денхардт}$: 0,1% фико-400, 0,1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% поливинилпирролидон.

1. Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. Вып. 4. С. 1057—1066.
2. Гринев Н. И. // Вестн. АМН СССР. 1981. № 2. С. 83—93.
3. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подымигоин М. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240—247.
4. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221—1229.
5. Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Левина А. С., Пичко Н. П., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 230—239.
6. Гимаутдинова О. И., Горшкова И. И., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Кутявин И. В. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. Вып. 6. С. 1419—1423.
7. Горшкова И. И., Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С., Соловьев В. В. // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. Вып. 4. С. 1084—1096.
8. Perelroyzen M. P., Vologodskii A. V. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 10. P. 4693—4704.
9. Соловьев В. В., Кель А. Э., Rogozin И. Б., Колчанов Н. А. Использование ЭВМ в молекулярной биологии. Введение в теорию генетических текстов. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1987. С. 58—70.
10. Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С. // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. Вып. 4. С. 1130—1136.
11. Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 780—787.
12. Brosius J., Dull T. J., Sleeter D. D., Noller H. F. // J. Mol. Biol. 1981. V. 148. № 2. P. 107—127.
13. Southern F. M. // J. Mol. Biol. 1975. V. 98. № 3. P. 503—534.
14. Donniss-Keller H. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2527—2538.
15. Соловьев В. В., Жарких А. А., Колчанов Н. А. // Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. Вып. 2. С. 524—536.
16. Tinoco I., Uhlenbeck O., Levine M. D. // Nature. 1971. V. 230. № 5296. P. 362—367.
17. Salser W. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1979. V. 42. P. 985—1002.
18. Moazed D., Stan S., Noller H. F. // J. Mol. Biol. 1986. V. 187. № 3. P. 399—416.
19. Tinoco I., Borer P. N., Deugler B., Levine M. D., Uhlenbeck O., Crothers D. M., Gralla J. // Nature New Biol. 1973. V. 246. № 5427. P. 40—41.
20. Heus H. F., Van Kimmenade J. V. A., Van Knippenberg P. H. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 11. № 1. P. 203—210.
21. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 74—83.
22. Mason Ph. J., Williams J. G. // Nucleic acid hybridization. A practical approach / Eds Hames B. D., Higgins S. J. Oxford — Washington: IRL Press, 1985. P. 113—138.
23. Barta A., Steiner G., Brosius J., Noller H. F., Kuechler E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 12. P. 3607—3611.

Поступила в редакцию
8.VIII.1989

M. A. ZENKOVA, G. G. KARPOVA, A. S. LEVINA, S. V. MAMAEV,
V. V. SOLOVIEV *

COMPLEMENTARY ADDRESSED ALKYLATION OF THE *ESCHERICHIA*
COLI 16S rRNA WITH 2', 3'-O-[4-N-METHYL-N-(2-CHLOROETHYL)-
AMINO]BENZYLIDENE DERIVATIVES OF
OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES. IV. IDENTIFICATION OF 16S rRNA
BINDING SITES WITH BENZYLIDENE DERIVATIVES
OF d(pACCTTGTT)rA, d(pTTACGACT)rU, d(pTTTGCTCCCC)rA

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian
Division, Academy of Sciences of the USSR;*

** Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Academy of Sciences
of the USSR, Novosibirsk*

By site-directed alkylation of 16S rRNA with benzylidene derivatives of d(pACCTTGTT)rA (II), d(pTTACGACT)rU (III), d(pTTTGCTCCCC)rA (IV) (reagents (II)–(IV)) followed by the RNase H treatment a number of 16S rRNA fragments have been obtained. Hybridisation of these fragments with restriction fragments of plasmid pKK 3535, containing operon *rrnB* of *E. coli* rRNAs, led to the identification of all reagents' binding sites in 16S rRNA. Good correlation is found between estimated stability of non-perfect 16S rRNA-oligodeoxyribonucleotide duplexes and the level of modification of this site with alkylating derivative of the same oligodeoxyribonucleotide. With high concentration of the reagents (II)–(IV) ($(2-5) \cdot 10^{-5}$ M) the site-directed alkylation proceeds not only at the desired site but also at other sites corresponding to non-perfect duplexes between 16S rRNA and the reagents. It should be noted that the modification mainly occurs in the non-perfect duplexes, carrying mismatched bases at the termini. Influence of the secondary structure of 16S rRNA on the site-directed modification is discussed.