



УДК 547.963.3.04

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ДРОЖЖЕВОЙ тРНК^{Phe}
В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ

Власов В. В., Пузырев А. Т.

*Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Эбель Ж. П., Жижге Р.

Институт молекулярной и клеточной биологии, Страсбург

Исследовано алкилирование остатков гуанозина и фосфатов дрожжевой тРНК^{Phe} с помощью реагентов 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]уридин-5'-метилфосфата (MerURCl) и пирозоэтилмочевины соответственно. Реакционная способность остатков гуанозина и фосфатов не зависит от их положения в структуре полинуклеотида в том случае, если модификация тРНК^{Phe} проводится в денатурирующих условиях. Реакционная способность различных остатков гуанозина и фосфатов в нативной тРНК^{Phe} существенно различается. Резко снижена реакционная способность остатков гуанозина, атомы N7 которых, по данным рентгеноструктурного анализа, участвуют в образовании водородных связей (G²², G⁵⁷) и во взаимодействии с ионами магния (G³⁰, G⁴³). Пониженной реакционной способностью обладают также остатки гуанозина в олигогуаниловых последовательностях. В нативной тРНК^{Phe} резко снижена реакционная способность фосфатов в положениях 9, 10, 11, 19, 49, 58, 59, 60 и, в меньшей степени, фосфатов в положениях 23 и 24.

До последнего времени для исследования пространственной структуры тРНК в растворе методом химических модификаций в основном использовались реагенты, не способные модифицировать основания, участвующие в комплементарных взаимодействиях (обзоры [1, 2]). Информативность метода химической модификации может быть существенно повышена при использовании реагентов, способных модифицировать функциональные группы оснований, не участвующие в формировании вторичной структуры полинуклеотидов, а также реагентов, модифицирующих универсальные фрагменты нуклеотидов — фосфатные группы и рибозу. Такими реагентами, в частности, являются производное 2-хлорэтиламина MerURCl, алкилирующее остатки гуанозина по атомам N 7 [3], и пирозоэтилмочевина, способная этилировать межнуклеотидные фосфаты [4, 5]. Атом N 7 гуанозина и фосфатные группы не участвуют в формировании вторичной структуры тРНК^{Phe}, но, по данным рентгеноструктурного анализа, в некоторых случаях формируют ее третичную структуру [1, 6, 7].

Целью настоящей работы было исследование пространственной структуры дрожжевой тРНК^{Phe} в растворе с помощью вышеназванных реагентов и сопоставление полученных результатов с данными о строении

Сокращение: MerURCl — 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]уридин-5'-метилфосфат.

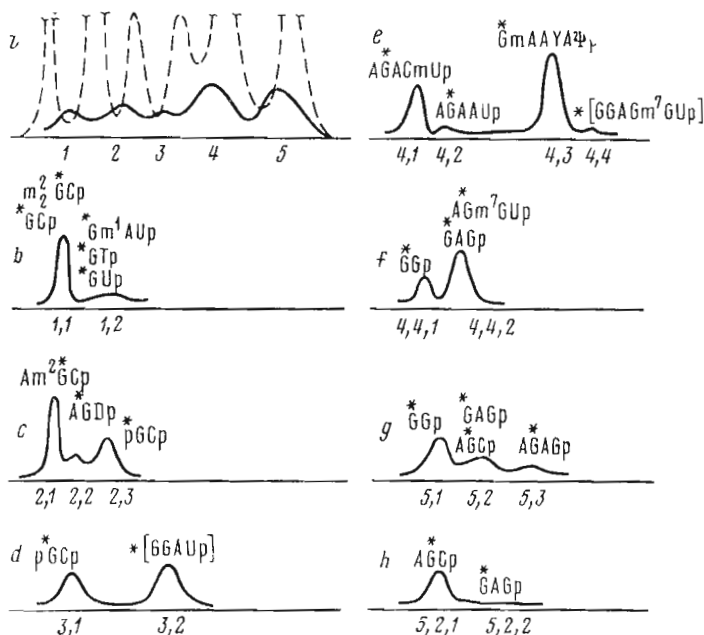


Рис. 1. Хроматографический анализ пиримидил-РНКазного гидролизата дрожжевой тРНК^{Phe}, модифицированной в условиях стабильности структуры тРНК, при pH 8,2 [8, 10] (a); рехроматография при pH 3,7 фракций 1—5, полученных в условиях рис. 1a (e—e), хроматография Т1-РНКазного гидролизата модифицированного олигонуклеотида *[GGAGm⁷GUp] (фракция 4.4) при pH 8,2 (f); хроматография Т1-РНКазного гидролизата модифицированного олигонуклеотида *[GGGAGAGCP] (фракция 5) при pH 8,2 (g); рехроматография фракции 5.2 при pH 3,7 (h). Сплошная линия — D₃₅₀; пунктирная — D₂₆₀. G̃ — модифицированный гуанозин, *[GGAGm⁷GUp] — олигонуклеотид с неопределенным положением модифицированных гуанозинов

тРНК^{Phe} в кристаллическом состоянии. Ранее нами с помощью модификации МерURCl была изучена структура тРНК^{Phe} из *E. coli* [8]. Часть результатов по алкилированию фосфатов дрожжевой тРНК^{Phe} опубликована в виде краткого сообщения [9].

Алкилирование дрожжевой тРНК^{Phe} с помощью МерURCl осуществляли как в условиях, обеспечивающих сохранение нативной структуры тРНК, так и в условиях, когда структура нуклеиновой кислоты была неупорядоченной. Реакцию проводили на малую глубину (1—2 моль реагента на 1 моль тРНК^{Phe}) для того, чтобы избежать повреждения молекул в ходе реакции и получить данные, отражающие реакционную способность остатков гуанозина в нативной, не измененной модификацией, структуре тРНК [10]. Нами проведен хроматографический анализ олигонуклеотидов пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК^{Phe}, алкилированной на глубину 1,5 моль реагента на 1 моль тРНК в условиях, когда тРНК имеет нативную структуру (рис. 1). Техника микроколоночной хроматографии и анализ олигонуклеотидов модифицированных тРНК были описаны ранее [8, 10]. Модифицированный гуанозин (G̃) после гидролиза ацетальной связи реагента при pH 4 имеет характерный УФ-спектр с максимумом в области 350 нм за счет остатка диалкиламинобензальдегида [11]. Поэтому наличие и количество модифицированных гуанозиновых звеньев в олигонуклеотидах можно определять с помощью спектрофотометрического анализа по ходу хроматографических разделений.

В результате были разделены следующие модифицированные олигонуклеотиды: A-m²G-Cp, A-G-Dp, G-G-A-Up, A-G-A-Cm-Up, A-G-A-A-Up, Gm-A-A-Y-A-Ψp, G-G-A-G-m⁷G-Up, G-G-G-A-G-A-G-Cp, а также pG-Cp,

Относительные константы скорости модификации остатков гуанозина в составе дрожжевой тРНК^{Phe} с помощью MerURCl в условиях неупорядоченной (А) и нативной (Б) структуры нуклеиновой кислоты

Нуклеозид	А	Б *	Нуклеозид	А	Б *
pG ^{1**}	20	6	G ²⁴	15	18(40)
G ¹	24	8(8,5)	G ²⁶ , G ⁷¹	35	8(G ⁷¹ 1,6)
G ³ , G ⁴	22	2	G ³⁰	26	21(2,4)
G ¹⁰	35	17(44,2)	G ³⁴	80	39(20,5)
G ¹⁵	22	3(3,8)	G ⁴²	14	2
G ¹⁸ , G ¹⁹	37	21(20)	G ⁴³ , G ⁴⁵	15	2
G ²⁰	29	1	G ⁵¹ , G ⁵³ , G ⁵⁷	22	3(G ⁵³ 3; G ⁵⁷ 1,7)
G ²²	16	3(1,8)	G ⁶⁵	21	1

* В скобках указаны относительные константы скоростей алкилирования для соответствующих остатков в тРНК^{Phe} из *E. coli* в аналогичных условиях.

** Модификация по концевому 5'-фосфату.

алкилированный по гуанозину или концевому фосфату. Алкилированные олигонуклеотиды G-Cp и m₂²G-Cp; G-m¹A-Up и G-Tr и G-Up не разделялись, поэтому можно было оценить лишь верхний предел реакционной способности остатков гуанозина, входящих в состав этих олигонуклеотидов. В некоторых случаях олигонуклеотиды пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК^{Phe} содержали несколько остатков гуанозина (см., например, фракции 3,2, 4,4 и 5 рис. 1). Такие олигонуклеотиды дополнительно гидролизовали Т1-РНКазой. Т1-РНКаза не расщепляет фосфодиэфирные связи, прилегающие к алкилированным остаткам гуанозина, поэтому отсутствие расщепления по соответствующей связи свидетельствует о наличии модифицированного гуанозина.

По данным результатов хроматографического анализа с учетом глубины алкилирования тРНК^{Phe} были рассчитаны относительные константы скорости модификации отдельных остатков гуанозина тРНК^{Phe} (таблица). Эти величины представляют собой отношение констант скоростей модификации отдельных остатков гуанозина к сумме скоростей побочных превращений реагента [8, 10]. Полученные данные свидетельствуют о том, что в неупорядоченной структуре тРНК^{Phe} все остатки гуанозина реагируют с MerURCl с близкими скоростями. При модификации нативной тРНК^{Phe} реакционная способность остатков гуанозина в различных участках структуры полинуклеотида существенно различается. Остатки гуанозина, N7-атомы которых не участвуют в каких-либо взаимодействиях и экспонированы (данные рентгеноструктурного анализа), обладают высокой реакционной способностью (G³⁴, G¹⁸, G¹⁹, G³⁰, G²⁴, G¹⁰). Остатки гуанозина в стеблевых участках тРНК^{Phe} (положения 3, 4, 42, 43) реагируют медленнее, очевидно, вследствие стекинг-взаимодействий. Остатки гуанозина 22- и -57, N7-атомы которых, по данным рентгеноструктурного анализа [1, 6, 7], участвуют в образовании водородных связей, обладают низкой реакционной способностью. Низкая реакционная способность остатков гуанозина-20 и -45 может быть объяснена тем, что их атомы N7 участвуют в связывании ионов магния [7, 12]. По-видимому, взаимодействием с катионами объясняется и низкая реакционная способность остатка гуанозина-15. Известно, что ионы кобальта могут связываться с N7-атомом гуанозина-15 в кристаллической тРНК^{Phe} [13]. Очевидно, в этом же участке тРНК могут связываться и другие катионы. Таким образом, результаты определения реакционной способности остатков гуанозина тРНК^{Phe} находятся в соответствии с рентгеноструктурными данными о расположении остатков гуанозина в этой молекуле. Можно сделать вывод, что в молекуле тРНК^{Phe}, находящейся в растворе, осуществляются те же взаимодействия между основаниями, что и в молекуле кристаллической тРНК^{Phe}. Сравнение

ние полученных результатов с данными по модификации с помощью MerURCl бактериальной тРНК^{Phe} [8] показывает, что обе тРНК^{Phe} имеют весьма сходные структуры (таблица).

Недавно были получены полуколичественные данные о реакционной способности N7-центров остатков гуанозина дрожжевой тРНК^{Phe} по отношению к диметилсульфату в условиях, разрушающих и стабилизирующих высшую структуру тРНК [14]. Алкилирование в этом случае регистрировали с помощью электрофоретического анализа фрагментов, образующихся при химическом расщеплении ³²P-меченной по концу алкилированной тРНК^{Phe}. Несмотря на различия в размерах реагентов, полученные в работе [14] результаты в основном согласуются с нашими данными. Различия имеют место в случае остатков гуанозина-24 и -45. Отнесение гуанозина-45 к числу реакционноспособных остатков в нативной тРНК^{Phe} [14] в отличие от наших данных, вероятно, явилось результатом ошибочного отнесения электрофоретических полос. Высокая реакционная способность гуанозина-24, выявленная в нашем случае, скорее всего объясняется повышенным сродством реагента MerURCl к участку структуры тРНК^{Phe} вблизи этого остатка.

При алкилировании межнуклеотидных фосфатов РНК нитрозоэтилмочевинной образуются фосфотриэфиры, по которым модифицированный полинуклеотид может быть расщеплен в слабощелочной среде [5]. Анализ получившихся при расщеплении фрагментов электрофорезом в случае ³²P-меченных по концу РНК позволяет изучать алкилирование отдельных фосфатов полинуклеотидов. Если алкилирование проводится на малую глубину, интенсивность расщепления по каждому из фосфатов отражает его реакционную способность в условиях модификации. Нами были проведены эксперименты по модификации тРНК^{Phe}, меченной по 3'- или 5'-концу, с помощью нитрозоэтилмочевины в условиях, стабилизирующих или разрушающих вторичную структуру тРНК. В используемых условиях степень модификации тРНК нитрозоэтилмочевинной была низкой: на 1 моль тРНК в среднем включалось ~0,2 моль этильных групп.

Чтобы проверить, не сказывается ли присутствие этанола в реакционной смеси на состоянии структуры тРНК^{Phe}, были проведены опыты по алкилированию тРНК^{Phe} в растворах, содержащих 10 и 5% этанола (при этом пропорционально уменьшалась концентрация реагента). Результаты, полученные при алкилировании тРНК^{Phe} в растворах, содержащих 5, 10 и 20% этанола, были идентичными (за исключением различия в общей степени модификации тРНК).

Метод не позволяет исследовать алкилирование фосфатов вблизи меченого конца тРНК, так как в процессе обработки тРНК после модификации используется осаждение этанолом, приводящее к неполному выделению коротких фрагментов полинуклеотида. В случае дрожжевой тРНК^{Phe} нельзя также получить данных о реакционной способности фосфатов в положениях 33 и 35, так как в положениях 32 и 34 этой тРНК содержатся остатки 2'-О-метилрибозы и соответствующие триэфиры стабильны в щелочной среде.

На рис. 2 представлены результаты одного из опытов по модификации нитрозоэтилмочевинной 3'-³²P-меченной тРНК^{Phe}. Для получения количественных данных о степени модификации различных фосфатов тРНК^{Phe} радиоавтограммы денситометрировали. Результаты экспериментов показали, что при алкилировании тРНК^{Phe} в условиях, когда полимер не имеет упорядоченной структуры, все фосфаты в его составе реагируют с близкими скоростями. При модификации нативной тРНК^{Phe} реакционная способность фосфатов в некоторых положениях тРНК^{Phe} оказывается резко сниженной. Особенно выражен эффект фосфатов в положениях 9, 10, 11, 19, 49, 58, 59, 60. Существенное снижение реакционной способности наблюдается для фосфатов в положениях 7, 8, 23, 24.

Отношения интенсивностей электрофоретических полос, соответствующие

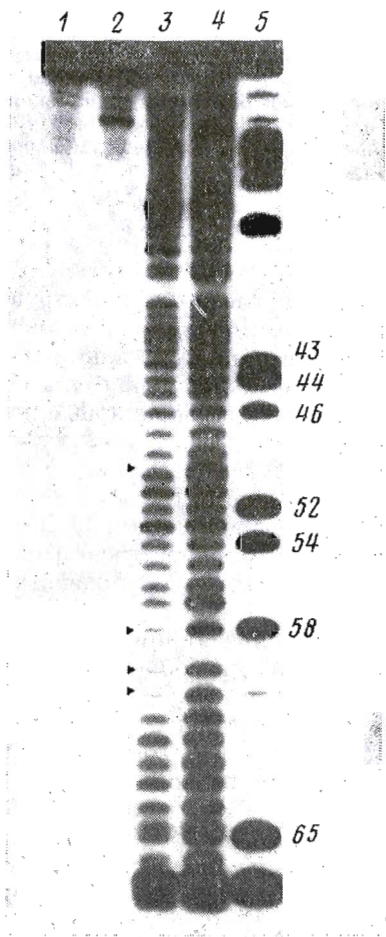


Рис. 2

Рис. 2. Радиоавтограмма полиакриламидного геля (20% акриламид, 8 М мочевины) по разделению фрагментов 3^{32}P -меченой тРНК^{Phe}, получающихся в результате алкилирования нитрозэтилмочевиной в условиях, стабилизирующих структуру тРНК (3; 1 — контроль), и в условиях, когда тРНК не имела упорядоченной структуры (4; 2 — контроль); 5 — тРНК^{Phe}, частично гидролизованная T1-РНКазой (приведены положения определенных гуанозинов). Треугольниками отмечены полосы, соответствующие расщеплениям по низкорекреационноспособным в нативной тРНК^{Phe} фосфатам 49, 58, 59, 60. Контроль — инкубация в тех же условиях, но без нитрозэтилмочевины

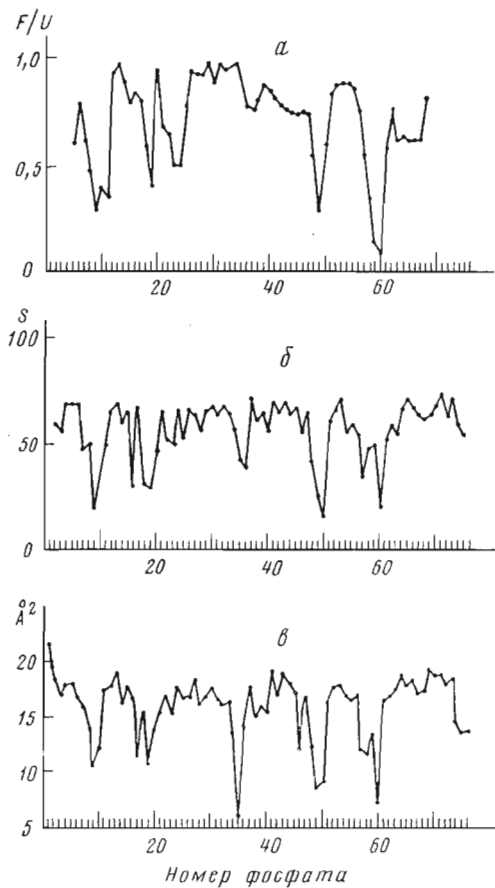


Рис. 3

Рис. 3. Относительная реакционная способность фосфатов тРНК^{Phe} в различных условиях. *a* — отношение интенсивностей соответствующих электрофоретических полос электрофореграмм в опытах по алкилированию тРНК^{Phe} нитрозэтилмочевиной в условиях, стабилизирующих структуру тРНК, к интенсивности полос в условиях, когда полинуклеотид не имел упорядоченной структуры; *б* — доступность фосфатов в структуре тРНК^{Phe} молекулам воды (*S*) [15]. Каждая точка представляет собой сумму доступностей молекулам воды обоих атомов кислорода данного фосфата; *в* — доступность кислородных атомов фосфатов тРНК^{Phe}, Å^2 для частицы диаметром 0,95 Å [16]

щих расщеплению по одинаковым фосфатам тРНК^{Phe}, полученных при алкилировании в условиях, стабилизирующих пространственную структуру, к интенсивности полос в условиях, денатурирующих тРНК, демонстрируют различия в реакционной способности одних и тех же фосфатов в нативной и денатурированной молекуле тРНК^{Phe} (рис. 3). Для сравнения на рисунке приведены также расчетные данные о доступности фосфатов частицам

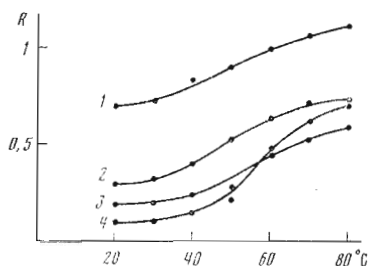


Рис. 4. Влияние температуры на реакционную способность фосфатов тРНК^{Phe} к алкилированию. R — отношение интенсивности электрофоретической полосы, соответствующей расщеплению по фосфату 24 (1), 11 (2), 59 (3), 60 (4), к интенсивности электрофоретической полосы, соответствующей расщеплению по фосфату, реакционная способность которого не уменьшается при формировании структуры тРНК^{Phe} (фосфаты 14 (1, 2) и 62 (3, 4))

размером порядка молекулы воды, основанные на рассмотрении структуры кристаллической тРНК^{Phe} [15, 16]. Учитывая, что реагент по размерам значительно больше молекулы воды, соответствие данных можно считать хорошим. Очевидно, основной причиной снижения реакционной способности фосфатов в тРНК^{Phe} является их пространственное экранирование от растворителя. Экранирование фосфатов происходит вследствие их участия во взаимодействиях, формирующих третичную структуру тРНК^{Phe}, — в образовании водородных связей (фосфаты в положениях 19, 58, 60) и во взаимодействиях с ионами магния (фосфаты в положениях 8, 9, 11, 19, 23, 24) [1, 7, 12]. Некоторое снижение реакционной способности фосфатов в положениях 21, 22, 36, 37, возможно, обусловлено также взаимодействием их с ионами магния [7, 12].

Развертывание третичной структуры тРНК^{Phe} при термической денатурации сопровождается увеличением реакционной способности низкорекреационноспособных фосфатов (рис. 4).

В экспериментах по алкилированию тРНК^{Phe} в растворах, содержащих кроме ионов магния и натрия органические катионы — этидийбромид и спермин в концентрациях до 10^{-3} М, — не было обнаружено каких-либо отличий по сравнению с данными по модификации тРНК^{Phe} в присутствии неорганических катионов.

Полученные в работе результаты суммированы на рис. 5, 6, где в структуре тРНК, изображенной в виде «клеверного листа», и на модели третичной структуры [17] показаны положения низкорекреационноспособных остатков гуансина.

На основании полученных результатов можно с уверенностью сделать вывод, что в растворе тРНК^{Phe} имеет ту же пространственную структуру, что и в кристаллическом состоянии. Разработанные методы изучения реакционной способности фосфатов и N7-атомов гуанозина по отношению к алкилирующим реагентам представляются перспективными для наблюдения за состоянием структуры тРНК в различных условиях и конформационными изменениями тРНК, в том числе конформационными изменениями, не сопровождающимися перестройками ее вторичной структуры. Так как большинство фосфатов и многие остатки гуанозина в нативной тРНК доступны для алкилирования, второй возможной областью применения этих модификаций является исследование взаимодействий тРНК с другими макромолекулами. Разработанный метод модификаций нитрозоэтилмочевинной применим для изучения структуры и взаимодействий любых меченных по концу РНК.

Экспериментальная часть

2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N - метиламино)бензилиден]уридин-5'-метилфосфат и нитрозоэтилмочевина были синтезированы как описано в работах [18, 19] соответственно. Использовали дрожжевую тРНК^{Phe} (Boehringer, Mannheim, ФРГ), РНКазу А (КФ 3.1.4.22; Calbiochem, США), T1-РНКазу (КФ 3.1.4.8) и T2-РНКазу (КФ 3.1.4.23) (обе получены от фирмы «Sankyo», Япония), DEAE-целлюлозу DE 23 SS (Serva, ФРГ),

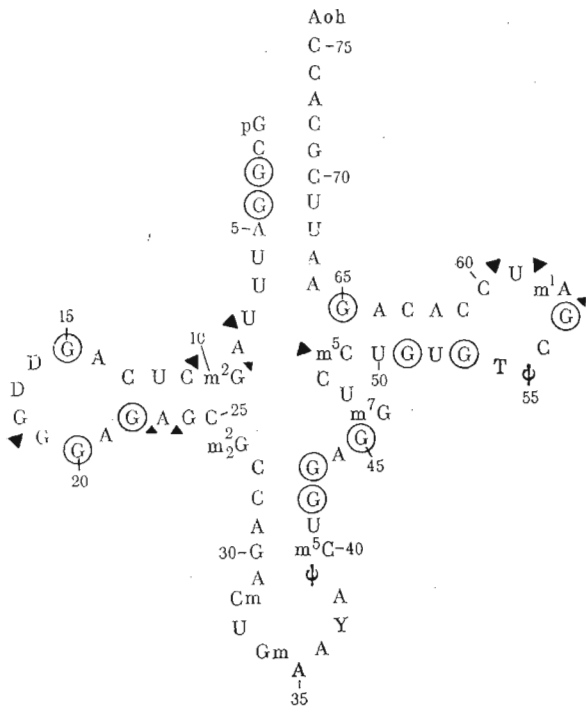


Рис. 5

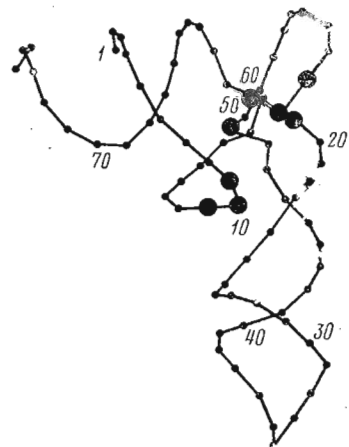


Рис. 6

Рис. 5. Структура дрожжевой тРНК^{Phe} в форме «клеверного листа». Указаны положения фосфатов, обладающих наиболее низкой реакционной способностью (треугольники), и остатки гуанозина, обладающие низкой реакционной способностью (обведены)

Рис. 6. Структура рибозофосфатного остова тРНК^{Phe}, рассчитанная по опубликованным координатам [17]. Точки — фосфаты. Увеличенные точки — фосфаты, обладающие наиболее низкой реакционной способностью

щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1) и фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1) (обе — продукты фирмы «Worthington», США). Полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78) и тРНК-нуклеотидилтрансфераза (КФ 2.7.7.25) были выделены как описано в работах [20] и [21] соответственно. Использованы [γ^{32} -P]АТФ с удельной радиоактивностью 2000–3200 Ки/ммоль и [α^{32} -P]АТФ с удельной радиоактивностью 200–400 Ки/ммоль (Amersham, Англия).

5'-Мечение и 3'-мечение тРНК^{Phe} проводили как описано в работе [22].

Алкилирование тРНК^{Phe} с помощью *MerURCl* осуществляли при 37°С в следующих ионных условиях: а) без специального добавления солей; б) в присутствии 0,1 М NaClO₄; 5,8 мМ Mg(ClO₄)₂. Реакционные смеси в каждом случае содержали 0,04 мМ тРНК^{Phe} и 15 мМ *MerURCl* в 0,04 М трис-НСlO₄ (rH 7,7), 0,5 мМ EDTA. Модификацию проводили 0,5–2 ч, после чего к реакционной смеси добавляли 0,25 объема 4 М NaCl, осаждали тРНК этанолом и дважды пересаждали из 0,3 М ацетата натрия этанолом. Расщепление ацетальной связи в модифицированной тРНК проводили инкубацией в 0,05 М ацетате натрия (рН 4,0) в течение 40 мин при 40°С [11]. Алкилированную тРНК осаждали этанолом, пересаждали этанолом из 0,3 М ацетата натрия, промывали этанолом и сушили в вакуум-эксикаторе. Степень модификации тРНК определяли по поглощению полимера при 260 и 350 нм. Коэффициент молярного поглощения модифицированных звеньев тРНК ϵ_{350} $23,8 \cdot 10^3$ [11], тРНК^{Phe} — $6,5 \cdot 10^5$ [23].

Модифицированную тРНК^{Phe} (0,03 мг) гидролизovali 4 ч РНКазой А (1 мкг) в 100 мкл 0,01 М трис-НСl, рН 7,7, при 37°С. Полученные оли-

гонуклеотиды анализировали микроколоночной хроматографией, как было описано ранее [8, 10]. Олигонуклеотиды первоначально фракционировали при pH 8,2 на колонках с DEAE-целлюлозой в 0,02 М трис-HCl, 7 М моче-вине, используя градиент концентрации NaCl 0–0,32 М (рис. 1).

Полученные фракции изоплит (1–5) разделяли на колонках с DEAE-целлюлозой при pH 3,7 (pH доводили HCOOH) в 8 М моче-вине. При раз-делениях использовали следующие градиенты концентрации NaCl: динук-леотиды 0,0–0,07 М NaCl (e) (фракция 1), тринуклеотиды 0,0–0,11 М NaCl (c) (фракция 2), тетра-нуклеотиды 0,0–0,13 М NaCl (d) (фракция 3), пента-нуклеотиды 0,0–0,14 М NaCl (e) (фракция 4). Объем хроматографических колонок 60 мкл, общий объем элюента 600 мкл, ско-рость элюции 150 мкл/ч. В процессе хроматографических разделений ре-гистрировали поглощение при 260, 290, 330, 350, 380 нм. Олигонуклеотиды идентифицировали по их спектрам и хроматографической подвижности при разделении при различных pH. Идентификацию подтверждали опре-делением нуклеотидного состава олигонуклеотидов [8].

Олигонуклеотиды, имеющие в своем составе несколько остатков гуано-зина (0,01 ОЕ₂₆₀), гидролизovali 2 ч в 200 мкл 0,01 М трис-HCl, pH 7,0, содержащих 4 ед. акт. РНКазы T1, при 37° С. Продукты гидролиза анали-зировали последовательными хроматографиями при pH 8,2 (рис. 1, *f, g*) и pH 3,7 (рис. 1, *h*). Количество модифицированных олигонуклеотидов определяли, измеряя площади соответствующих пиков на хроматографи-ческих профилях при 350 нм. Относительные константы скорости алки-лирования отдельных остатков гуанозина рассчитывали как описано ра-нее [8].

Алкилирование тРНК^{Phe} нитрозоэтилмочевиной в условиях, стабилизи-рующей структуру тРНК, проводили 3 ч при 20° С в 0,3 М какодилате натрия, pH 8,0, содержащем 0,02 М MgCl₂, 0,1 М NaCl, 2 мМ EDTA. В том случае, когда тРНК не имела упорядоченной структуры, алкилирование тРНК^{Phe} проводили 2 мин при 80° С в 0,3 М какодилате натрия (pH 8,0) с 2 мМ EDTA. Нитрозоэтилмочевину добавляли в реакционную смесь в виде концентрированного раствора в этаноле – 5 мкл раствора реагента к 20 мкл буферного раствора, содержащего 2 мкг тРНК. При этом концен-трация реагента составляла 0,15 М. В контрольных экспериментах вместо раствора реагента в реакционную смесь добавляли этанол.

Алкилирование тРНК^{Phe} при различных температурах (20, 30, 40, 60, 70, 80° С) проводили аналогично.

Алкилированные образцы пересаждали этанолом.

Расщепление фосфотриэфирных связей осуществляли 5-минутной ин-кубацией алкилированной тРНК^{Phe} при 50° С в 10 мкл 0,1 М трис-HCl, pH 9,0. Образцы расщепленной тРНК^{Phe} пересаждали этанолом, сушили в вакуум-экзикаторе и анализировали гель-электрофорезом в 15 и 20% полиакриламидных гелях, как описано в работе [24]. Радиоавтографы ге-лей сканировали с помощью денситометра «Transydine-2955» (Transy- dine General corp., США), используя линейную шкалу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rich A., Rajbhandary U. L. Transfer RNA: molecular structure, sequence and pro- perties.— Ann. Rev. Biochem., 1976, v. 45, p. 805–860.
2. Goddard J. P. The structure and functions of transfer RNA.— Prog. Biophys. Molec. Biol., 1977, v. 32, p. 233–308.
3. Беликова А. М., Гринева Н. И. Алкилирование нуклеиновых кислот и их компо- нентов.— Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., 1971, вып. 5, № 12, с. 119–124.
4. Singer B., Fraenkel-Conrat H. The specificity of different classes of ethylating agents toward various sites in RNA.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 4, p. 772–782.
5. Kusmierek J. T., Singer B. Sites of alkylation of poly(U) by agents of varying carcinogenicity and stability of products.— Biochem. et biophys. acta, 1976, v. 442, № 3, p. 420–431.
6. Holbrook S. R., Sussman J. L., Warrant R. W., Kim S. H. Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA. II. Structural features and functional implications.— J. Mol. Biol., 1978, v. 123, № 4, p. 631–660.

7. *Hingerty B., Brown R. S., Jack A.* Further refinement of the structure of yeast tRNA^{Phe}.— *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 124, № 3, p. 523–534.
8. *Власов В. В., Скобельцына Л. М.* Исследование макроструктуры тРНК^{Phe} (*E. coli*) методом химических модификаций.— *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 4, с. 550–561.
9. *Vlassov V. V., Giege R., Ebel J. P.* Investigation of the structure of tRNA^{Phe} in solution by means of phosphodiester bonds modification with ethylnitrosourea.— *FEBS Lett.*, 1980, v. 120, № 1, p. 12–16.
10. *Власов В. В., Кнорре Д. Г.* Реакционная способность некоторых остатков гуанидина дрожжей тРНК^{Phe}, ее половин и их комплекса.— *Молекулярн. биология*, 1974, т. 8, № 2, с. 234–243.
11. *Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринцева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Теплова Н. М.* Взаимодействие транспортной РНК с ацетальными 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегида — производными уридина и уридин-5'-метилфосфата.— *Молекулярн. биология*, 1970, т. 4, № 1, с. 30–36.
12. *Quigley G. J., Teeter M. M., Rich A.* Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 1, p. 64–68.
13. *Jack A., Ladner J. E., Rhodes D., Brown R. S., Klug A.* A crystallographic study of metal binding to yeast phenylalanine transfer RNA.— *J. Mol. Biol.*, 1977, v. 111, № 2, p. 315–328.
14. *Peattie D. A., Gilbert W.* Chemical probes for high-order structure in RNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, № 8, p. 4679–4682.
15. *Thiyagarajan P., Ponnuswamy P. K.* Solvent accessibility study on tRNA^{Phe}.— *Biopolymers*, 1979, v. 18, № 9, p. 2233–2247.
16. *Lavery R., Pullman A., Pullman B.* The electrostatic molecular potential of yeast tRNA^{Phe}. III. The molecular potential and the steric accessibility associated with the phosphate groups.— *Theoret. chim. acta*, 1980, v. 57, № 1, p. 233–243.
17. *Quigley G. J., Seeman N. C., Wang A. H.-J., Suddath F. L., Rich A.* Yeast phenylalanine transfer RNA: atomic coordinates and torsion angles.— *Nucl. Acids Res.*, 1975, v. 2, № 12, p. 2329–2339.
18. *Гринцева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.* Алкилирующие производные компонент нуклеиновых кислот. VII. Метилловый эфир 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]-уридин-5'-фосфата.— *Ж. общ. химии*, 1970, т. 40, № 2, с. 215–221.
19. *Общий практикум по органической химии под ред. А. Н. Коста.* М.: Мир, 1965, с. 515–516.
20. *Panet A., van de Sande J. H., Loewen P. C., Khorana H. G., Raae A. J., Lillehaug J. R., Klapper K.* Physical characterisation and simultaneous purification of bacteriophage T₄ induced polynucleotide kinase, polynucleotide ligase and deoxyribonucleic acid polymerase.— *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 25, p. 5045–5050.
21. *Rether B., Bonnet J., Ebel J. P.* Studies on tRNA nucleotidyltransferase from baker's yeast.— *Eur. J. Biochem.*, 1974, v. 50, № 1, p. 281–288.
22. *Silberklang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L.* The use of nuclease P₁ in sequence analysis of end group labeled RNA.— *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 12, p. 4091–4108.
23. *Wintermeyer W., Zachau H. G.* Replacement of Y base, dihydrouracyl and 7-methylguanine in tRNA by artificial odd bases.— *FEBS Lett.*, 1971, v. 18, № 2, p. 214–218.
24. *Sanger F., Coulson A. R.* The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing.— *FEBS Lett.*, 1978, v. 87, № 1, p. 107–110.

Поступила в редакцию 14.I.1981
После доработки 16.III.1981

CHEMICAL MODIFICATION STUDIES ON THE STRUCTURE OF tRNA^{Phe} IN SOLUTION

VLASOV V. V., PUZYRIOV A. T., EBEL J. B., GIEGE R.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk; Institut de Biologie
Moleculaire et Cellulaire du CNRS, Strasbourg*

Alkylation of guanosine residues and phosphates in yeast tRNA^{Phe} with 2',3'-O-[4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene]uridine-5'-methylphosphate and with ethylnitrosourea, respectively, was investigated. In unfolded tRNA^{Phe}, the reactivity of guanosines and phosphates was not dependent on their position in the tRNA structure, whereas in the native tRNA^{Phe} the reactivity of various phosphates and guanosines showed large variations. Guanosine residues whose N7 atoms, according to X-ray data, are involved either in hydrogen bond formation (G²² and G⁵⁷) or magnesium ion binding (G²⁰ and G⁴⁵) have their reactivity severely suppressed. Low reactive were also guanosines in some oligoguanyl sequences. In the native tRNA^{Phe}, reactivity of phosphates in positions 9, 10, 11, 19, 49, 58, 59, 60 were strongly suppressed, some drop being also observed for phosphates in positions 23 and 24.