



УДК 577.113.4 : 577.152.312*64

© 1991 г.

М. А. Зенкова, Г. Г. Карпова, А. С. Левина,
С. В. Мамеев, Ю. Н. Пазарова, О. С. Федорова

КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННОЕ АЛКИЛИРОВАНИЕ 16S рРНК
ESCHERICHIA COLI 2',3'-О-[4-N-МЕТИЛ-N-(2-ХЛОРЕТИЛ)-
АМИНО]БЕНЗИЛИДЕНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
V *. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА
СЕЛЕКТИВНОСТЬ МОДИФИКАЦИИ

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР, Новосибирск, 630090

Изучено влияние различных факторов (концентрации реагента, температуры, присутствия 3',5'-дифеназинового производного олигонуклеотида, стабилизирующего комплекс рРНК с реагентом) на селективность сайт-направленной модификации РНК на примере комплементарно адресованной модификации 16S рРНК *E. coli* в условиях стабильности вторичной структуры с помощью 2',3'-О-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензилиденового производного олигонуклеотида р(dTTTGCTCCCC)гА, комплементарного участку 771—781 рРНК. Определена константа кооперативного связывания реагента и олигонуклеотида-эффектора (3',5'-дифеназинового производного октануклеотида, комплементарного участку 782—789 рРНК) с 16S рРНК. Показано, что повышение температуры от 20 до 40° С приводит к увеличению в 1,5 раза относительной степени модификации рРНК по участку 771—781. В присутствии олигонуклеотида-эффектора при концентрации реагента около $1 \cdot 10^{-8}$ М селективность модификации РНК по участку 771—781 при 20° С увеличивается более чем в 2 раза при сохранении высокой общей степени модификации рРНК. При понижении концентрации реагента в реакционной смеси до $1 \cdot 10^{-7}$ М такой же уровень селективности достигается в отсутствие эффектора. Однако при этом наблюдается почти 20-кратное снижение общей степени алкилирования 16S рРНК.

Одной из основных проблем, с которой сталкиваются исследователи сайт-направленного воздействия на нуклеиновые кислоты (НК) как *in vitro* [2, 3], так и в живой клетке *in vivo* [4, 5], является проблема повышения селективности направленного воздействия, иными словами, проблема точности взаимодействия «адресованного» реагента с НК-мишенью и пути ее повышения.

Ранее в работах [1, 6—8] при изучении сайт-направленной модификации 16S рРНК *E. coli* бензилиденовыми производными олигодезоксирибонуклеотидов было обнаружено, что при сайт-направленном алкилировании 16S рРНК в условиях стабильности пространственной структуры (ионная сила 0,37 М) при концентрации реагента $(0,5—3) \cdot 10^{-5}$ М [6] наряду с модификацией вблизи выбранного участка происходит эффективное алкилирование 16S рРНК по ряду других последовательностей, которые образуют с адресованным реагентом несовершенные комплексы. Проблема повышения селективности адресованной модификации сводится в этом случае к исключению из сферы реакции несовершенных комплексов между НК-мишенью и «адресованным» реагентом.

В настоящее время существует несколько подходов, позволяющих избежать образования несовершенных комплексов между НК-мишенью и реагентом. Во-первых, проведение сайт-направленной модификации при температуре, близкой к температуре плавления (T_m) совершенного дуплекса (T_m комплекса олигонуклеотидной части реагента с выбранной по-

* Сообщение IV см. работу [4].

следовательностью) [9]. Во-вторых, снижение концентрации реагента в реакционной смеси. Однако наряду с этим происходит уменьшение степени модификации РНК по выбранной последовательности вследствие уменьшения степени связывания реагента в комплементарный дуплекс [10].

Сравнительно недавно в работах [11, 12] был предложен принципиально новый путь повышения селективности сайт-направленной модификации, основанный на использовании олигонуклеотидов-эффекторов, несущих остатки N-(2-гидроксиэтил)феназина на одном или обоих концах и комплементарного последовательности НК-мишени, прилегающей к сайту связывания адресованного реагента [13]. В этом случае повышение селективности происходит вследствие кооперативного связывания реагента и эффектора с НК-мишенью и удлинения в результате этого двуспиральной области, образованной НК, реагентом и олигонуклеотидом-эффектором.

В настоящей работе на примере сайт-направленной модификации 16S рРНК 2',3'-O-[4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензильденовым производным р(dTTTGCTCCCC)гА (реагент I*) проанализирована возможность применения данных подходов для повышения селективности сайт-направленной модификации 16S рРНК в условиях стабильности вторичной структуры РНК-мишени.

Сайт-направленную модификацию 16S рРНК реагентом (I) проводили в ТМК₃₅₀ — буфере реконструкции рибосом, как описано в работе [6]. Адресованное алкилирование 16S рРНК осуществляли при концентрации РНК, равной $0,5 \cdot 10^{-6}$ М (как во всех предыдущих исследованиях [1, 6—8]) и $2,5 \cdot 10^{-8}$ М. Использование более низких концентраций РНК ($(0,5—1,0) \cdot 10^{-8}$ М) приводит к незначительному осаждению РНК из реакционной смеси и затрудняет точное определение степени модификации 16S рРНК. В экспериментах по определению зависимостей степени модификации 16S рРНК от концентрации реагента (изотерм модификации) был использован реагент (I), несущий ³²P-радиоактивную метку на 5'-конце олигонуклеотидного фрагмента. В этих экспериментах для отделения 16S рРНК (модифицированную РНК не отделяли от немодифицированной) от избытка не вступившего в реакцию реагента использовали денатурирующий электрофорез в 6% полиакриламидном геле (ПААГ).

Для получения препаративных количеств ковалентных аддуктов — продуктов комплементарно адресованной модификации 16S рРНК реагентом (I) — использовали ¹⁴C-меченый реагент, а отделение РНК от избытка не вступившего в реакцию реагента проводили с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы в присутствии 0,5% додецилсульфата натрия, как описано в работе [14]. Выделенный ковалентный аддукт гидролизуют РНКазой H и по 3'-ОН-группам образовавшихся фрагментов РНК вводят ³²P-метку с помощью ³²P-Ср и T4-РНК-лигазы. Полученную таким образом смесь меченых фрагментов 16S рРНК использовали далее для идентификации сайтов взаимодействия с реагентом (I) с помощью блот-гибридизации этих фрагментов с гель-электрофоретически разделенными фрагментами рестрикции рДНК. По окончании гибрилизации фильтр подвергали стадиям промывки, инкубации с РНКазой A и повторной отмывке, как описано в работе [1]. После такой обработки (РНКазой A) связанными с фрагментами ДНК на фильтре остаются только те части меченых фрагментов РНК, которые защищены комплексообразованием с фрагментами рДНК. Поэтому обнаружение радиоактивной метки в месте, соответствующем какому-либо определенному фрагменту рестрикции, однозначно свидетельствует о положении сайта связывания реагента (I) внутри участка РНК, соответствующего данному фрагменту рестрикции. Определение сайтов связывания реагента с 16S рРНК проводили, сопоставляя размеры гибридирующихся фрагментов рДНК с картой рестрикции фрагмента *Bam*HI-*Xba*I (3240 п. о.), содержащего полную последовательность 16S рРНК [1].

* Реагент (I) идентичен реагенту (IV) в работах [1, 6—8].

Зависимость селективности комплементарно адресованной модификации 16S рРНК реагентом (I) от температуры *

[I], 10^{-5} М	t, °C	α_0	Селективность сайт-направленной модификации			
			α_1	α_1/α_0	α_2	α_2/α_0
4	20	2,57	0,63	24,5	1,60	62,5
4	40	0,64	0,23	35,3	0,41	64,8

* [16S рРНК] 0,5 мМ; α_0 — степень модификации, моль реагента (I)/моль 16S рРНК; α_1 — степень модификации 16S рРНК по участку 771—781; α_2 — степень модификации 16S рРНК по участкам 442—452, 663—673, 883—893 и 771—781.

Ранее было показано, что в 16S рРНК содержится 12 участков связывания для реагента (I). Три участка (663—673, 442—452, 883—893) из 12, найденных для реагента (I), образовывали с ним несовершенные комплексы, близкие по стабильности совершенному гетеродуплексу реагента (I) с выбранной последовательностью 771—781 [1].

Поскольку используемый метод не позволяет точно определить степень модификации по каждому из 12 участков 16S рРНК, способных связываться с реагентом (I), в табл. 1—3 приведены следующие параметры: общая степень модификации 16S рРНК (α_0 = моль остатков реагента (I)/моль 16S рРНК; степень модификации 16S рРНК реагентом (I) по выбранной последовательности 771—781 в составе совершенного комплекса (α_1), а также суммарная степень модификации 16S рРНК по трем участкам, образующим с реагентом (I) наиболее прочные несовершенные комплексы (663—673, 442—452, 883—893), и по выбранному участку (771—781) (α_2). Общая степень модификации 16S рРНК (α_0) определялась по количеству 14 C-радиоактивности, содержащейся в 16S рРНК после алкилирования и отделения от избытка реагента (I) (подробно см. «Экспериментальную часть»). Степени модификации 16S рРНК α_1 и α_2 определяли по площади пика, соответствующего фрагменту рестрикции, включающему данный участок, при сканировании радиоавтограммы фильтра после блот-гибридизации, отмывки и обработки РНКазой А, как описано в работе [1].

В качестве меры селективности сайт-направленной модификации были выбраны: а) относительная степень модификации 16S рРНК по выбранному участку (771—781) (α_1/α_0); б) относительная степень модификации 16S рРНК в четырех наиболее стабильных комплексах, включая комплекс с выбранным участком (α_2/α_0).

Влияние температуры на селективность комплементарно адресованной модификации 16S рРНК реагентом (I). 16S рРНК обладает стабильной пространственной структурой до 40° С [15]. Поэтому сайт-направленную модификацию 16S рРНК реагентом (I) проводили при 20, 30 и 40° С в течение времени, соответствующего одному периоду полупревращения N-2-хлорэтилариламинногруппы в этилениммониевый катион [16]. Ранее было показано [7], что с увеличением времени протекания реакции относительные степени модификации рРНК по каждому из участков связывания не меняются, т. е. независимо от глубины протекания реакции при данной концентрации НК-мишени и реагента одновременно существуют все возможные комплексы реагента с рРНК, как совершенные, так и несовершенные.

Мы показали, что при повышении температуры от 20 до 40° С наблюдается примерно 3,5—4-кратное снижение общей степени модификации (α_0) комплементарно адресованного алкилирования рРНК реагентом (I) (рис. 1). Ранее в работе [6] был проведен анализ изотерм модификации 16S рРНК реагентом (I) при 20 и 40° С, из которого следовало, что при повышении температуры алкилирования до 40° С число участков связывания реагента (I) с 16S рРНК изменяется от 12 (при 20° С) до 4 (при 40° С). Поэтому можно было ожидать исключения из сферы реакции некоторой части несовершенных комплексов 16S рРНК-реагент (I).

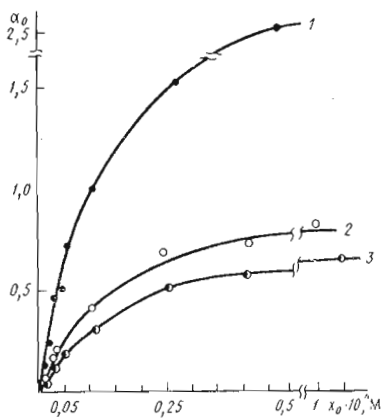


Рис. 1. Изотермы модификации 16S рРНК реагентом (I) при 20 (1), 30 (2) и 40° С (3); [16S рРНК] 0,5 мкМ; время алкилирования 30,3 (1), 6,5 ч (2), 101 мин (3); x_0 — концентрация реагента (I), α_0 — общая степень модификации 16S рРНК

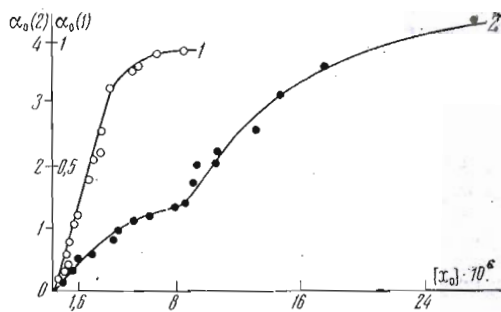


Рис. 2. Изотермы модификации 16S рРНК реагентом (I) при 20° С: 1 — [16S рРНК] $2,5 \cdot 10^{-8}$ М; 2 — [16S рРНК] $0,8 \cdot 10^{-6}$ М (приведена в соответствии с работой [6]); α_0 и x_0 — см. рис. 1; время алкилирования составляет 90,9 и 170 ч для кривых 1 и 2 соответственно

Из табл. 1 видно, что с увеличением температуры алкилирования до 40° С относительная степень модификации 16S рРНК реагентом (I) по выбранному участку увеличивается в 1,5 раза (от 20 до 30 %). Степень модификации 16S рРНК реагентом (I) по выбранной последовательности (α_1) при этом уменьшается от 0,63 до 0,23. Следует отметить, что, согласно результатам анализа кинетической схемы комплементарно адресованной модификации [10], максимально достижимый уровень алкилирования НК-мишени реагентами такого типа по выбранной последовательности составляет 0,63 моль реагента/моль НК-мишени. Поэтому можно считать (с учетом ошибки эксперимента), что при 20° С происходит максимально возможное алкилирование 16S рРНК по выбранной последовательности, однако селективность процесса при этом не превышает 24 %.

Влияние концентрации реагента (I) на селективность сайт-направленной модификации. Эксперименты для концентрации реагента (I) менее $0,5 \cdot 10^{-6}$ М проводили при более низкой концентрации 16S рРНК, равной $2,5 \cdot 10^{-8}$ М, по сравнению с концентрацией 16S рРНК, использованной во всех предыдущих экспериментах и равной $\sim 0,5 \cdot 10^{-6}$ М [1, 6—8]. Зависимости степени модификации 16S рРНК реагентом (I) при 20° С от концентрации реагента (I) представлены на рис. 2. Видно, что кривая 1 имеет тенденцию к насыщению и выходит на плато при концентрациях реагента (I) $7,5 \cdot 10^{-6}$ — $1,0 \cdot 10^{-5}$ М. Предельная степень модификации 16S рРНК практически равна 1. Эти результаты можно сопоставить с аналогичной зависимостью, полученной при концентрации 16S рРНК, равной $0,8 \cdot 10^{-6}$ М (кривая 2), так как в обоих случаях реагент (I) находится в избытке по отношению к 16S рРНК. Из сопоставления изотерм модификации рис. 2 (кривые 1 и 2) отчетливо видно, что зависимость степени модификации 16S рРНК от концентрации реагента имеет два платовых значения: 1 (при концентрации реагента $5 \cdot 10^{-6}$ М) и 3,5—4,0 (при концентрации реагента (I) $\sim 0,3 \cdot 10^{-4}$ М). Следует отметить, что такой вид зависимости характерен для реакций, протекающих с участием ступенчатого комплексообразования [18]: на первом этапе происходит преимущественное связывание реагента в совершенный комплекс и в три несовершенных комплекса, близких ему по стабильности, а затем, при увеличении концентрации реагента (I), образуются другие несовершенные комплексы.

Данные табл. 2 подтверждают это. Видно, что при понижении концентрации реагента примерно в 20 раз резко возрастает селективность алкилирования: реакция протекает в основном в четырех наиболее стабильных комплексах, включая комплекс с участком 771—781, и на 40 % по выбранному участку (771—781). Однако общая степень модификации 16S

Зависимость селективности сайт-направленной модификации при 20° С от концентрации реагента (I) *

[I], мкМ	α_0	Селективность сайт-направленной модификации			
		α_1	α_1/α_0 , %	α_2	α_2/α_0 , %
0,13	0,05	0,02	38,3	0,046	92
0,25	0,10	0,025	25,1	0,088	88
1,3	0,34	0,067	19,6	0,29	86,7
2,5	0,62	0,13	21,9	0,50	80,7

* Обозначения идентичны табл. 1; [16S рРНК] $2,5 \cdot 10^{-6}$ М.

рРНК (α_0) при этом не превышает 0,05. С увеличением концентрации реагента (I) и ростом α_0 постепенно снижается селективность процесса, и при концентрации реагента, равной $2,5 \cdot 10^{-6}$ М, селективность реакции снижается до 20%. Таким образом, при низких концентрациях реагента можно получить высокоселективную модификацию НК-мишени, однако степень модификации РНК при этом будет невысокой. Полученные результаты хорошо согласуются с выводами, представленными в работах [9, 18].

Влияние олигонуклеотида-эффектора на селективность сайт-направленной модификации 16S рРНК реагентом (I). В работах [13, 19] была продемонстрирована высокоселективная сайт-направленная модификация 302-членного фрагмента ДНК 6-звеньевыми «адресованными» реагентами в присутствии 8-звенного олигонуклеотида-эффектора, несущего N-(2-гидроксиэтил)феназилияевые группы на 3'- и 5'-концах. В присутствии олигонуклеотида-эффектора выход реакции сайт-направленной модификации ДНК составлял 14% при определенной концентрации реагента, тогда как в отсутствие эффектора модификация фрагмента ДНК при этой концентрации реагента не наблюдалась. Представлялось интересным использовать олигонуклеотид-эффектор для увеличения селективности алкилирования 16S рРНК по выбранному участку 771—781. Согласно данным работы [13], эффектор положительно влияет на выход комплементарно адресованной модификации в том случае, когда эффектор комплементарен последовательности НК-мишени, вплотную прилегающей к участку связывания реагента, и обеспечивает кооперативное связывание реагента.

В качестве олигонуклеотида-эффектора для реагента (I) был выбран 8-звенный олигонуклеотид рТААТСТГр, несущий остатки N-(2-гидроксиэтил)феназилия на обоих концах, комплементарный последовательности 16S рРНК 782—789, прилегающей с 3'-конца к выбранной для реагента (I) последовательности 771—781. Схематическое изображение участка 16S рРНК, включающего последовательности, комплементарные реагенту (I) и эффектору, представлены на рис. 3.

Зависимости степени модификации 16S рРНК реагентом (I) от концентрации олигонуклеотида-эффектора изучались при 20 и 40° С. При 20° С существует довольно узкий интервал концентраций эффектора (рис. 4, 1—3) — от $2 \cdot 10^{-3}$ до $1 \cdot 10^{-1}$ М. В этом интервале увеличение концентрации эффектора приводит к заметному повышению степени модификации 16S рРНК реагентом (I) (α_0). Наибольшее увеличение α_0 в присутствии эффектора до 0,32 и 0,40 наблюдается при концентрациях реагента (I), равных $0,5 \cdot 10^{-6}$ и $1,5 \cdot 10^{-6}$ М соответственно (рис. 4, 1 и 2). Степень модификации 16S рРНК в отсутствие эффектора при этих же концентрациях реагента (I) равна 0,03 и 0,10 соответственно. При увеличении концентрации реагента до $5 \cdot 10^{-6}$ М прирост α_0 за счет присутствия эффектора имеет тенденцию к выходу на плато (0,25; 0,30; 0,38; 0,40 для кривых 1, 2, 4, 5 соответственно), а значение α_0 стремится к 1 (рис. 4, 5). Выход на плато с $\alpha_0 = 1$ в отличие от предельного значения $\alpha_0 = 2,5$ в отсутствие эффек-

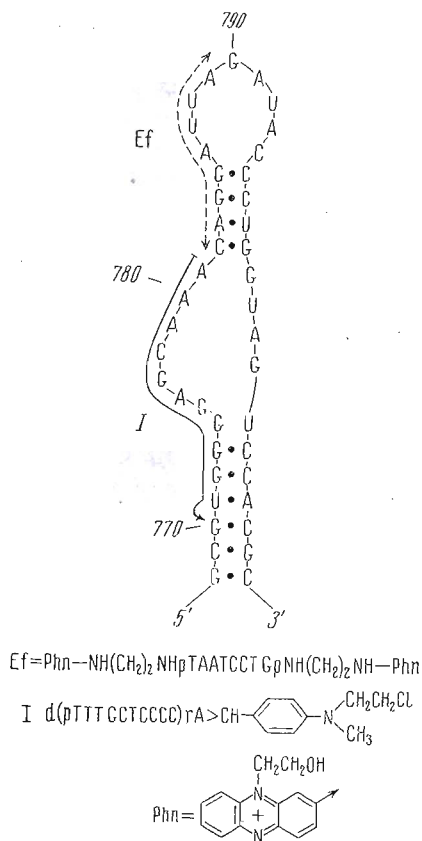


Рис. 3

Рис. 3. Район 16S рРНК, включающий сайт полной комплементарности к реагенту (I) (обозначен сплошной линией) и олигонуклеотиду-эффектору (обозначен штриховой линией). Внизу приведены структуры олигонуклеотидного реагента (I) и олигонуклеотида-эффектора (Ef)

Рис. 4. Зависимости степени модификации 16S рРНК (α_0) от концентрации олигонуклеотида-эффектора (e_0) при 20° С и концентрации реагента (I), равной 0,5 (1), 1,5 (2), 2,5 (3), 4 (4), 5 мкМ (5). [16S рРНК] 0,5 мкМ; α_0 — см. рис. 1

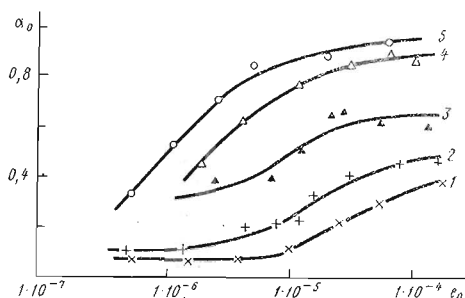


Рис. 4

тора (рис. 1, I) указывает на то, что эффектор способствует связыванию реагента (I) с 16S рРНК только в одном участке.

Данные по изменению селективности сайт-направленной модификации 16S рРНК в присутствии эффектора получены с помощью блот-гибридизации (табл. 3). Реакцию алкилирования проводили при 20° С в течение 90 ч, что соответствует трем периодам полупревращения реагента в этилениммониевый катион. Как видно из табл. 3, увеличение степени модификации (α_0) 16S рРНК в присутствии эффектора обусловлено приростом степени модификации по выбранному участку (α_1). При сайт-направленном алкилировании 16S рРНК реагентом (I) в отсутствие эффектора на долю модификации по участку 771—781 приходится около 20%, тогда как в присутствии эффектора эта величина возрастает в 2 раза. Из сопоставления данных, приведенных в табл. 1 и 3, видно, что в присутствии олиго-

Таблица 3

Влияние олигонуклеотида-эффектора (Ef) на селективность комплементарно адресованной модификации 16S рРНК реагентом (I) *

[I], мкМ	[Ef], мкМ	α_0	Селективность сайт-направленной модификации			
			α_1	$\alpha_1/\alpha_0, \%$	α_2	$\alpha_2/\alpha_0, \%$
0,5	50	0,64	0,24	38,8	0,47	73
0,5	—	0,25	0,048	20,0	0,17	68
1,5	50	0,92	0,42	45,0	0,66	72
1,5	—	0,51	0,10	20,5	0,33	65
5,0	50	1,18	0,62	54,0	0,85	72
5,0	—	0,60	0,13	24,5	0,35	60

* Все обозначения идентичны табл. 1; [16S рРНК] 0,5 мкМ.

нуклеотида-эффектора количественная модификация 16S рРНК вблизи выбранной последовательности 771—781 наблюдается лишь при концентрации реагента $5 \cdot 10^{-6}$ М. Реагента, взятого в более низких концентрациях — $(0,5-1,5) \cdot 10^{-6}$ М,— по-видимому, недостаточно для количественного связывания с участком 771—781. Таким образом, при 20° С и концентрации РНК, равной $0,5 \cdot 10^{-6}$ М, олигонуклеотид-эффектор за счет стабилизации совершенного дуплекса значительно увеличивает степень модификации РНК по выбранному сайту, не затрагивая при этом модификацию 16S рРНК в составе несовершенных дуплексов с реагентом (I).

Путем оптимизации экспериментальных данных, представленных на рис. 4, была определена константа кооперативного связывания реагента X и олигонуклеотида-эффектора Ef с РНК-мишенью Р (K_{XEF}), которая оказалась равной $K_{XEF} = (8,4 \pm 3,5) \cdot 10^{10}$ М⁻² (см. Приложение).

При изучении зависимости степени модификации 16S рРНК реагентом (I) (α_0) от концентрации олигонуклеотида-эффектора при 40° С (данные не приводятся) было обнаружено, что α_0 при таких же, как и для 20° С (рис. 4), концентрациях реагента (I) (x_0) практически не зависит от концентрации эффектора (e_0) в интервале e_0 от $1 \cdot 10^{-6}$ до $2 \cdot 10^{-4}$ М. Отсутствие влияния олигонуклеотида-эффектора при 40° С обусловлено, вероятно, тем, что величина $K_{XEF}^{40^\circ C}$ относительно невысока и при используемых значениях x_0 и e_0 значение произведения $K_{XEF}^{40^\circ C} \cdot e_0 \cdot x_0$ (подробно см. Приложение) недостаточно для эффективного комплексообразования. Аналогичные результаты были получены при изучении зависимости α_0 от концентрации эффектора при более низких концентрациях реагента (I) (концентрация 16S рРНК равна $2,5 \cdot 10^{-8}$ М). В этих условиях заметное влияние олигонуклеотида-эффектора на сайт-направленную модификацию 16S рРНК реагентом (I) начинает проявляться при e_0 порядка $5 \cdot 10^{-5}$ М, однако платовых значений α_0 достичь при этом не удается.

Таким образом, метод повышения селективности комплементарно адресованной модификации с помощью олигонуклеотидов-эффекторов, несущих остатки N-(2-гидроксиэтил)феназения, успешно использовавшийся для повышения эффективности действия «адресованных» реагентов на синтетические олигонуклеотиды [11] и фрагмент ДНК с маловыраженной вторичной структурой [13, 19], оказался достаточно продуктивным в применении к высокомолекулярным РНК, обладающим сложной пространственной структурой. Из полученных в настоящей работе данных следует, что при концентрациях реагента порядка 10^{-6} М использование олигонуклеотида-эффектора приводит к более чем 2-кратному увеличению селективности процесса сайт-направленного алкилирования (от 24 до 54%) при сохранении высокой степени алкилирования ($\alpha_0 = 1,18$ в присутствии и $\alpha_0 = 0,60$ в отсутствие эффектора). При понижении концентрации реагента до 10^{-7} М практически такой же уровень селективности реакции алкилирования достигается без применения олигонуклеотида-эффектора, но при этом степень модификации рРНК снижается в 20 раз. Увеличение температуры алкилирования до 40° С при постоянной концентрации реагента приводит к 1,5-кратному увеличению селективности алкилирования.

Экспериментальная часть

В работе использовали 30S субчастицы рибосом *E. coli*, любезно предоставленные С. В. Кирилловым и В. И. Махно (ЛИЯФ АН СССР), РНКазу Н *E. coli*, любезно предоставленную Н. В. Чичковой (МГУ), плазмиду рКК 3535 [20], любезно предоставленную Г. Ф. Ноллером; Т4-РНК-лигазу (154 000 ед. акт./мл; НПО «Фермент», Вильнюс); РНКазу А (НПО «Биолар», Рига); рестриктазы *XbaI*, *VamNI*, *MspI*, *HaeIII*, *AclI* (НПО «Вектор», Кольцово); 5'-[³²P]-цитидин-3',5'-дифосфат с уд. акт. более 1 ПБк/моль отечественного производства; агарозу (Sigma, США); среды фирмы Gibco (Англия); капроновую мембрану (диаметр пор 0,2 мкм) производства экспериментальной лаборатории Р/К «Хийу Ка-

лур» (Эстония); все остальные реактивы — фирм Merck, Serva (ФРГ) и Fluka (Швейцария).

Денситометрический профиль рентгеновской пленки после радиоавтографии получали с помощью лазерного сканера Ultrascan, площади пиков определяли по программе GelScan (LKB, Швеция).

Выделение 16S рРНК, подготовка к сайт-направленному алкилированию реагентом (I); препаративное выделение ковалентных аддуктов 16S рРНК с этим реагентом, 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, 6—8].

Синтез бензильденевого производного олигодезоксирибонуклеотида $d(p\text{TTTTGCTCCCC})\text{rA}$ — реагента (I) — проводили как описано в работе [21] в случае использования [4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]-[^{14}C]бензальдегида.

В случае получения ^{32}P -меченого реагента (I) реакционная смесь (50 мкл) содержала 0,5—1,0 ОЕ₂₆₀ цетавлоновой соли $^{32}\text{P}(d\text{TTTTGCTCCCC})\text{rA}$, 30 мкмоль [4-N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]бензальдегида, 36 мкмоль диметоксипропана, 120 мкмоль трифторуксусной кислоты (ТФА). Перед добавлением ТФА реакционную смесь замораживали в жидком азоте. После добавления ТФА реакцию проводили в течение 45 мин при 20° С, как описано в работе [22]. Перед нейтрализацией реакционную смесь вновь замораживали и добавляли 480 мкмоль триэтиламина. Затем нуклеотидные компоненты реакционной смеси осаждали 2 мл 2% перхлората лития в абсолютном ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием и высушивали в вакууме. Выделение ^{32}P -меченого реагента (I) проводили на колонке (50 мкл) со смолой Lichrosorb RP-18 в градиенте концентрации метанола в присутствии 50 мМ ацетата триэтиламиния, рН 7,4. Удельная активность реагента (I) составляла 140—280 МБк/мкмоль.

Введение ^{32}P -метки по 5'-концевому фосфату олигонуклеотида $p(d\text{TTTTGCTCCCC})\text{rA}$ с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и T4-полинуклеотидкиназы проводили как описано в работе [23].

Синтез олигонуклеотида-эфффектора $\text{PhnNH}(\text{CH}_2)_2\text{NH-pTAATCCTGr-NH}(\text{CH}_2)_2\text{NHPhn}$ (где Phn — N-(2-гидроксиэтил)феназин) проводили в соответствии с работой [24]; молярный коэффициент поглощения получившегося эфффектора составил $\epsilon_{260} = 101\ 400\ \text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$.

Комплекментарно адресованное алкилирование 16S рРНК проводили в течение 30,3 ч при 20° С, 6,5 ч при 30° С и 101 мин при 40° С в буфере ТМК₃₅₀ (50 мМ трис-НСl, рН 7,4; 20 мМ MgCl₂, 0,35 М КCl) при концентрации 16S рРНК, равной $0,5 \cdot 10^{-6}$ и $2,5 \cdot 10^{-8}$ М, варьируя концентрацию реагента (I) или олигонуклеотида-эфффектора при постоянной концентрации реагента (I). Реакционная смесь во всех экспериментах содержала 5 пмоль 16S рРНК и имела объем 10 мкл при концентрации 16S рРНК $0,5 \cdot 10^{-6}$ М и 200 мкл при концентрации рРНК $2,5 \cdot 10^{-8}$ М. Реакцию останавливали осаждением РНК из реакционной смеси 10 объемами 2% перхлората лития в ацетоне. В случае концентрации РНК, равной $2,5 \cdot 10^{-8}$ М, к реакционной смеси перед осаждением добавляли 0,3 ОЕ₂₆₀ суммарной тРНК в качестве носителя. Осадок рРНК и не вступившего в реакцию реагента отделяли центрифугированием, промывали ацетоном и сушили в вакууме. Затем осадок 16S рРНК и реагента растворяли в 5 мкл 7 М мочевины и наносили на 6% ПААГ, содержащий 7 М мочевины ($20 \times 30 \times 0,02$ см). Электрофорез осуществляли до выхода бромфенолового синего из геля. Визуализацию рРНК в геле проводили с помощью радиоавтографии на пленку РМБ-1 и/или с помощью окраски бромистым этидием в течение 15 мин. Полосу 16S рРНК вырезали и степень модификации РНК определяли по количеству ^{32}P -радиоактивности в полосе 16S рРНК. Количество 16S рРНК в полосе принималось равным $5 \times A$ пмоль. Величину А (выход 16 рРНК) рассчитывали по уравнению

$$A = \frac{{}^{32}\text{P}_0 - {}^{32}\text{P}_k}{{}^{32}\text{P}_0},$$

Для вышеприведенной кинетической схемы полагаем, что реагент может образовывать с НК-мишенью n различных комплексов, а эффектор связывается только с одним участком на мишени. Поэтому накопление продукта модификации описывается уравнением

$$\frac{d([PZ] + [PZEf])}{dt} = k_1(n[PI] + [PIEf]), \quad (1)$$

а исчезновение реагента описывается уравнением

$$\frac{dx}{dt} = -k_0x, \quad (2)$$

где $x = [X] + n[PX] + [PXEf]$.

Имеется также три уравнения материального баланса:

$$nP_0 = n[P] + [PEf] + n[PX] + [PXEf] + n[PR] + [PREf] + [PZ] + [PZEf], \quad (3)$$

$$x_0 = [X] + n[PX] + [PXEf] + [R] + n[PR] + [PREf] + [PZ] + [PZEf], \quad (4)$$

$$e_0 = [Ef] + [PEf] + [PXEf] + [PREf] + [PZEf], \quad (5)$$

где p_0 , x_0 , e_0 — исходные концентрации мишени, реагента и эффектора. Для нахождения решения уравнения (1) полагаем концентрации комплексов PX , PR , $PXEf$, $PREf$, PEf , $PZEf$ квазиравновесными, а также предполагаем, что гидролиз реагента не приводит к изменению его сродства с мишенью. Следовательно, можно записать

$$\begin{aligned} \frac{[PX]}{[P] \cdot [X]} = \frac{[PR]}{[P] \cdot [R]} = K_x, \\ \frac{[PXEf]}{[P] \cdot [X] \cdot [Ef]} = \frac{[PREf]}{[P] \cdot [R] \cdot [Ef]} = K_{xEf}; \quad \frac{[PZEf]}{[PZ][Ef]} = \frac{K_{xEf}}{K_x}, \\ \frac{[PEf]}{[P] \cdot [Ef]} = K_{Ef} \end{aligned} \quad (6)$$

Считаем, что концентрации промежуточных частиц I , PI и $PIEf$ квазистационарны, т. е.

$$\frac{d[I]}{dt} = k_0[X] + k_{-1}(n[PI] + [PIEf]) - (k_2 + nk_1[P] + k_1[PEf])[I] = 0, \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d([PI] + [PIEf])}{dt} = k_0(n[PX] + [PXEf]) + k_1(n[P] + [PEf])[I] - \\ - (k_1 + k_{-1})(n[PI] + [PIEf]) = 0. \end{aligned} \quad (8)$$

Рассмотрим случай, когда концентрации x_0 и e_0 превышают концентрацию нуклеиновой кислоты p_0 . Обозначим продукты модификации нуклеиновой кислоты $[PZ] + [PZEf] = Z$. Тогда нахождение зависимости концентрации Z от времени сводится к решению системы из одного дифференциального и двух алгебраических уравнений:

$$\frac{dZ}{dt} = \frac{k_0x_0e^{-k_0t}[P] \left\{ (nK_x + K_{xEf}[Ef]) \left[1 + \frac{k_1}{k_2}[P] (n + K_{Ef}[Ef]) \right] + \frac{k_1}{k_2} (n + K_{Ef}[Ef]) \right\}}{\left[1 + \frac{k_1}{k_2}[P] (n + K_{Ef}[Ef]) + \frac{k_{-1}}{k_1} \right] (1 + nK_x[P] + K_{xEf}[P][Ef])}, \quad (9)$$

$$nP_0 = Z + [P] \{ n + K_{Ef}[Ef] - (nK_x + K_{xEf}[Ef]) [nP_0 - x_0 - [P] (n + K_{Ef}[Ef])] \}, \quad (10)$$

$$\begin{aligned} e_0 = [Ef] + K_{Ef}[P][Ef] - K_{xEf}[P][Ef] [nP_0 - x_0 - [P] (n + K_{Ef}[Ef])] + \\ + \frac{Z \cdot K_{xEf} \cdot [Ef]}{K_x + K_{xEf}[Ef]}. \end{aligned} \quad (11)$$

Таким образом, для нахождения трех неизвестных концентраций имеются уравнения (9)—(11), содержащие параметры K_x , K_{E1} , K_{XF1} , k_1/k_2 и k_{-1}/k_1 . Поскольку эти параметры неизвестны, их можно найти из экспериментальных данных (кинетические или концентрационные зависимости степени модификации) путем оптимизации. В настоящей работе эти параметры находили по программе, включающей минимизацию суммы квадратичных отклонений, на ЭВМ БЭСМ-6 (ВЦ СО АН СССР). Для упрощения сначала находили значение K_x для экспериментов по модификации в отсутствие олигонуклеотида-эффектора, а затем использовали его для нахождения величин остальных параметров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С., Мамаев С. В., Соловьев В. В.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 788—800.
2. *Zamesnic P. C., Goodchild J., Taguchi G., Sarin P. S.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 9. P. 4143—4146.
3. *Tarrprich W. E., Hill W. E.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 3. P. 556—560.
4. *Sazepave Ch., Lorean G., Thuong N. T., Toulme J.-J., Helene C.* // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 12. P. 4717—4736.
5. *Погодина В. В., Фролова Т. В., Абрамова Т. В., Власов В. В., Иванова Е. М., Кутявин И. В., Плетнев А. Г., Якубов Л. А.* // Докл. АН СССР. 1988. Т. 301. № 5. С. 1257—1260.
6. *Горикова И. И., Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С., Соловьев В. В.* // Молекуляр. биология. 1986. Т. 20. Вып. 4. С. 1084—1096.
7. *Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С.* // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. Вып. 4. С. 1057—1066.
8. *Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 780—787.
9. *Hearst J. E.* // Photobiochemistry and Photobiophysics. 1987. Suppl. P. 23—32.
10. *Кнорре Д. Г., Чимитова Т. А.* // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. Вып. 4. С. 814—821.
11. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
12. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1220.
13. *Kutiavin I. V., Podymingoin M. A., Bazhina Yu. N., Fedorova O. S., Knorre D. G., Levina A. S., Mamaev S. V., Zarytova V. F.* // FEBS Lett. 1988. V. 238. № 1. P. 35—38.
14. *Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Левина А. С.* // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. Вып. 4. С. 1030—1036.
15. *Allen S. H., Wong K.-P.* // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 14. P. 8759—8766.
16. *Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г.* // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1969. Вып. 1. С. 104—109.
17. *Гринева Н. И.* // Аффинная модификация биополимеров / Ред. Д. Г. Кнорре. Новосибирск: Наука, 1983. С. 187—212.
18. *Perelroyzen M. P., Vologodskii A. V.* // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 10. P. 4693—4704.
19. *Vlassov V. V., Zarytova V. F., Kutiavin I. V., Mamaev S. V., Podymingoin M. A.* // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 10. P. 4065—4076.
20. *Brosius J., Dull T. J., Slecter D. D., Noller H. F.* // J. Mol. Biol. 1981. V. 148. № 2. P. 107—127.
21. *Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И.* // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 1. С. 31—38.
22. *Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г.* // Журн. общей химии. 1970. Т. 40. № 2. С. 215—222.
23. *Donnis-Keller H.* // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2527—2538.
24. *Амирханов Н. В., Зарытова В. Ф., Левина А. С.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1523—1530.
25. *Knorre D. G., Chimitova T. A.* // FEBS Lett. 1984. V. 131. № 2. P. 249—252.

Поступила в редакцию
30.III.1990

После доработки
6.VII.1990

M. A. ZENKOVA, G. G. KARPOVA, A. S. LEVINA, S. V. MAMAEV,
Yu. N. NAZAROVA, O. S. FEDOROVA

SEQUENCE-SPECIFIC ALCYLATION OF 16S rRNA *ESCHERICHIA COLI*
WITH 2',3'-O-[4-N-METHYL-N-(2-CHLOROETHYL)-AMINO]-
BENZYLIDENE DERIVATIVE OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES.
V. INVESTIGATION OF THE FACTORS AFFECTING THE
SELECTIVITY OF MODIFICATION

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

We studied the effect of different factors (reagent concentration, temperature, presence of oligonucleotide-effector (3',5'-diphenazinium derivative of oligodeoxyribonucleotide) stabilizing duplex RNA-reagent) on the selectivity of the site-directed modification of 16S rRNA with 2,3'-O-[4-N-methyl-N-(2-chloroethyl)-amino]-benzylidene derivative of oligonucleotide p(dTTTGCTCCCC)rA (reagent I) under conditions of secondary structure stability. The constant of cooperative binding of the reagent and oligonucleotide-effector with 16S rRNA was determined. The temperature rise from 20 to 40° C brought about a 1.5-fold increase in the relative extent of modification at the target site 771—781. In the presence of oligonucleotide-effector, which is a full complementary copy of the 782—789 fragment of 16S rRNA (reagent concentration is $1 \cdot 10^{-6}$ M), the selectivity of the RNA modification at the target site is doubled and a high level of the modification is retained. When the reagent concentration in the reaction mixture was decreased down to $1 \cdot 10^{-7}$ M, the same level of selectivity was achieved without the oligonucleotide-effector. Under these conditions, however, a drastic (20-fold) drop of the level of the 16S rRNA alkylation was observed.