



УДК 547.963.3.

ИССЛЕДОВАНИЕ МАКРОСТРУКТУРЫ тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*)  
МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ

Власов В. В., Скобелъкина Л. М.

Новосибирский институт органической химии СО Академии наук СССР

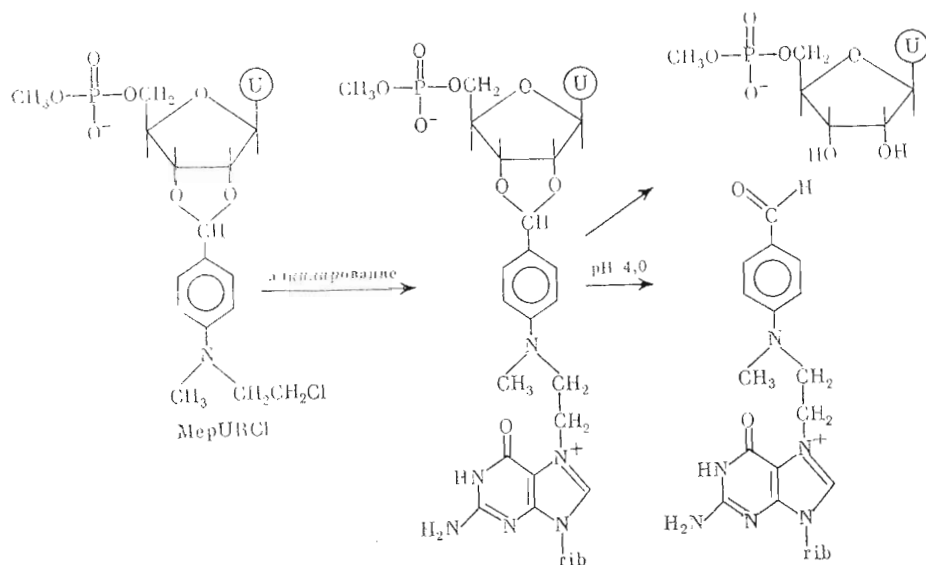
Исследована реакция алкилирования тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) производным 2-хлорэтиламина 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]-уридин-5'-метилфосфатом (MerURCl). Получены количественные характеристики индивидуальной реакционной способности большинства остатков гуанозина этой тРНК в различных условиях. Проведено сопоставление реакционной способности остатков гуанозина тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) с их взаимодействиями в макроструктуре тРНК. Найдено, что остатки гуанозина, атомы N-7 которых могут участвовать в образовании водородных связей (G<sub>22</sub>, G<sub>57</sub>), и остатки гуанозина, взаимодействующие с ионами магния (G<sub>15</sub>), а также s<sup>4</sup>U<sub>3</sub> наименее реакционноспособны по отношению к алкилирующему реагенту MerURCl. При разрушении третичной структуры тРНК<sup>Phe</sup>, в отсутствие ионов магния, реакционная способность этих нуклеозидов резко повышается. Реакционные способности различных остатков гуанозина двуспиральных областей тРНК различаются, вероятно, за счет «стэкинг»-взаимодействий. Аномально высокую реакционную способность имеют остатки гуанозина G<sub>10</sub> и G<sub>24</sub>. Определение реакционных способностей остатков гуанозина тРНК по отношению к алкилирующим реагентам может служить чувствительным тестом на конформационные изменения тРНК.

Ранее нами был разработан экспериментальный подход к исследованию макроструктуры нуклеиновых кислот методом химических модификаций, основанный на применении алкилирующих реагентов и определении реакционной способности отдельных нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот [1, 2]. Чтобы получить информацию о нативной, не измененной в результате модификации структуре полимера, было предложено проводить модификацию на малую глубину. Используя этот подход, мы исследовали ранее алкилирование тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> дрожжей и ее «половину» с помощью MerURCl [1—3].

В настоящей работе детально изучена реакция тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) с MerURCl. Получены данные о реакционной способности отдельных остатков гуанозина этой тРНК и исследовано изменение реакционной способности этих нуклеозидов при разрушении макроструктуры тРНК<sup>Phe</sup>. Выбор тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) для исследования был обусловлен тем, что она наиболее широко используется при изучении взаимодействия тРНК с рибосомами, Tu-фактором и аминоксил-тРНК-связывающими. Метод химических модификаций может дать интересную информацию о взаимодействии тРНК с этими компонентами белоксинтезирующей системы. Первичные структуры тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) и дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> в участках, обеспечивающих формирование третичной структуры тРНК, различаются незначительно. Поэтому данные по реакционной способности гуанозинов

Сокращения: 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]-уридин-5'-метилфосфат — MerURCl; G<sup>\*</sup>, s<sup>4</sup>U<sub>3</sub><sup>\*</sup> — алкилированные остатки гуанозина и 4-тиоуридина соответственно.

тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) могут быть сопоставлены с результатами рентгено-структурного анализа дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> [4]. Чтобы оценить реакционную способность остатков гуанозина тРНК<sup>Phe</sup> в зависимости от их положения в макроструктуре тРНК, проводили алкилирование тРНК<sup>Phe</sup> с помощью MerURCl в условиях, обеспечивающих стабильность макро-структуры тРНК: в 0,1 М NaClO<sub>4</sub>; 0,0058 М Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0,03 М Трис-ClO<sub>4</sub>, рН 7,7, при 37° [5,7]. В параллельных опытах проводили модификацию в условиях, когда третичная структура тРНК разрушена и тРНК имеет структуру «развернутого клеверного листа» (0,1 М NaClO<sub>4</sub>; 0,03 М Трис-ClO<sub>4</sub> — рН 7,7; 37°), а также в условиях частичного плавления вторичной структуры тРНК (0,03 М Трис-ClO<sub>4</sub>, рН 7,7; 37° [5—7]).



Препараты алкилированной тРНК<sup>Phe</sup> гидролизовали панкреатической РНКазой и полученные олигонуклеотиды анализировали последовательными хроматографиями при рН 8,2 и 3,7 на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine [2]. В некоторых случаях для разделения близких по свойствам олигонуклеотидов применяли хроматографию на макропористом анионообменнике Partisil 10 SAX. При этом удалось разделить большинство модифицированных олигонуклеотидов. На рис. 1 приведены данные хроматографического анализа олигонуклеотидов пиримидил-рибонуклеазного гидролизата тРНК<sup>Phe</sup>, модифицированной в условиях, когда макро-структура тРНК была разрушена. Модифицированные олигонуклеотиды количественно определяли, регистрируя поглощение УФ-света в области 350 нм [1, 2, 8].

Олигонуклеотиды идентифицировали по нуклеотидному составу (см. «Экспериментальную часть»). Относительные количества различных модифицированных олигонуклеотидов определяли по данным хроматографического анализа. Из этих величин с учетом степени модификации тРНК можно рассчитать относительные константы скорости алкилирования  $k_i$ , характеризующие реакционную способность отдельных олигонуклеотидов и отдельных остатков гуанозина, как описано в разделе «Экспериментальная часть». Данные по реакционной способности отдельных остатков гуанозина тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) приведены в табл. 1.

Алкилирующий реагент MerURCl модифицирует тРНК в мягких условиях в основном по остаткам гуанозина [8]. Так как реагирует атом азота гуанозина N-7, находящийся в широком желобке двойной спирали нук-

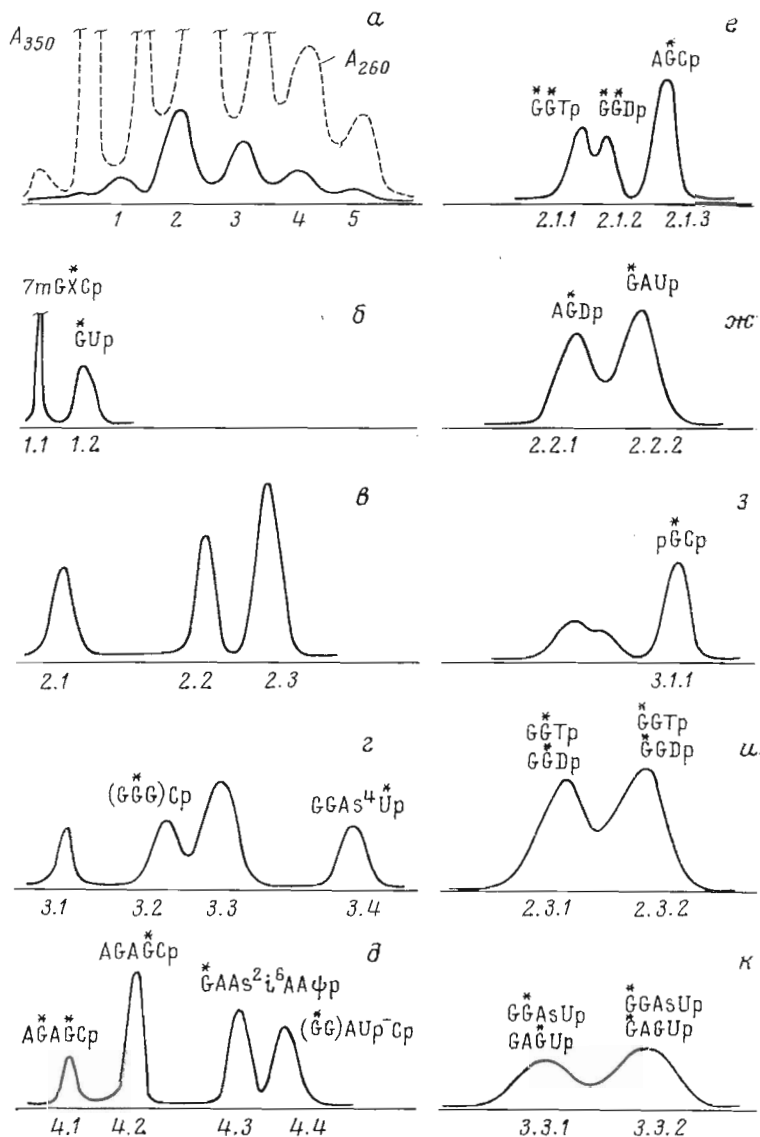


Рис. 1. Хроматографический анализ пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli*, модифицированной MerURCl (*a* — *д* — на DEAE-целлюлозе, *e* — *к* — на Partisil 10 SAX, *a* — pH 8,2, *б* — *к* — pH 3,7). *a* — гидролизат модифицированной тРНК<sup>Phe</sup>; *б* — модифицированные динуклеотиды 1; *в* — модифицированные тринуклеотиды 2; *г* — тетра- и пентануклеотиды 3; *д* — пента- и гексануклеотиды 4; *e* — тринуклеотиды 2.1; *ж* — тринуклеотиды 2.2; *з* — тетра- и пентануклеотиды 3.1; *и* — тринуклеотиды 2.3; *к* — тетра- и пентануклеотиды 3.3.]

леиновых кислот, алкилирование протекает как по однопочечным, так и по двуспиральным участкам структуры нуклеиновых кислот [9]. На реакционную способность остатков гуанозина в составе тРНК по отношению к алкилирующим реагентам могут влиять следующие факторы: 1) в некоторых случаях (при формировании третичной структуры тРНК) атомы N-7 остатков гуанозина могут принимать участие в образовании водородных связей [4]; 2) N-7-атомы остатков гуанозина могут участвовать во взаимодействии с ионами металлов, в частности с ионами  $Mg^{2+}$  [10]; так как реакционноспособная промежуточная частица при алкилировании MerURCl несет положительный заряд, такие взаимодействия:

Относительная реакционная способность отдельных остатков гуанозина в составе тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli* при разной степени «разворачивания» пространственной структуры (условия а, б и в, см. «Экспер. часть»)

G <sub>j</sub>	k <sub>j</sub>			k <sub>j</sub> (Б) k <sub>j</sub> (А)	k <sub>j</sub> (Б) k <sub>j</sub> (В)	G <sub>j</sub>	k <sub>j</sub>			k <sub>j</sub> (Б) k <sub>j</sub> (А)	k <sub>j</sub> (Б) k <sub>j</sub> (В)
	А	Б	В				А	Б	В		
G <sub>1</sub>	8,5	14,2	47,2	1,7	3,3	G <sub>27-30</sub>	2,4	5,0	7,7	2,1	1,6
G <sub>5-6</sub>	14,7	16,6	18,6	1,1	1,1	G <sub>34</sub>	20,5	27,2	31,1	1,3	1,1
s <sup>4</sup> U <sub>8</sub>	0,9	17,4	9,7	18,9	0,6	G <sub>44, X<sub>47</sub></sub>	8,3	21,9	24,6	2,6	1,1
G <sub>10</sub>	44,2	27,2	40,8	0,6	1,5	G <sub>52</sub>	35,5	42,2	50,2	1,2	1,2
G <sub>15</sub>	3,8	28,6	37,8	7,5	1,3	G <sub>53</sub>	<0,5	37,8	44,6	>70,0	1,2
G <sub>18</sub>	20,8	19,7	31,9	0,9	1,6	G <sub>57</sub>	1,7	25,6	36,1	15,0	1,4
G <sub>19</sub>	19,6	17,7	28,3	0,9	1,6	G <sub>63+G<sub>5</sub></sub>	1,3	15,9	24,7	12,4	1,6
G <sub>22</sub>	1,8	6,1	7,8	3,4	1,3	G <sub>65+G<sub>6</sub></sub>	5,2	19,4	29,0	3,7	1,5
G <sub>24</sub>	40,3	32,8	42,4	0,8	1,3	G <sub>69-71</sub>	1,6	3,1	5,5	1,9	1,8

\* В составе фрагмента GGAUр-Ср.

могут тормозить реакцию; наоборот, отрицательно заряженные группы вблизи N-7 центров гуанозина должны ускорять реакцию; 3) «стэкинг» гуанозина с другими нуклеозидами тРНК должен уменьшать его реакционную способность [11]. Все перечисленные взаимодействия реализуются в тРНК.

Из данных табл. 1 видно, что остатки гуанозина, находящиеся в различных участках структуры тРНК<sup>Phe</sup>, значительно различаются по реакционной способности. Относительно высокой реакционной способностью характеризуются остатки гуанозина, находящиеся в петле антикодона (G<sub>34</sub>) и в D-петле (G<sub>18</sub> и G<sub>19</sub>) (рис. 2). Эти нуклеозиды находятся в легко доступных для реагентов областях молекулы тРНК<sup>Phe</sup>. В дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> G<sub>18</sub> и G<sub>19</sub> образуют водородные связи с ψ<sub>55</sub> и G<sub>56</sub> соответственно; их атомы азота N-7 не вовлечены ни в какие взаимодействия [4]. По-видимому, это имеет место и в случае тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*). Известно, что эти остатки гуанозина в дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> быстро реагируют с кетоксалам [12]; находящиеся в аналогичных положениях в структуре дрожжевой тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> остатки гуанозина легко вступают в реакцию с МерURCl [1, 2] и карбодимидом [13].

Заметные различия наблюдаются в реакционной способности остатков гуанозина, находящихся в акцепторном и антикодонном стеблях тРНК<sup>Phe</sup>. Все они реагируют значительно медленнее остатков гуанозина петлевых участков структуры тРНК<sup>Phe</sup>, вероятно, потому, что находятся в пурпировых последовательностях, характеризующихся высоким «стэкингом» (G<sub>69</sub>—G<sub>71</sub>; G<sub>27</sub> — G<sub>30</sub>). Несколько быстрее реагируют остатки гуанозина G<sub>5</sub> и G<sub>6</sub>, значительно быстрее реагирует концевой остаток гуанозина G<sub>1</sub>.

Разделение и количественное определение модифицированных олигонуклеотидов, m<sup>7</sup>G-X-Ср и G-Ур затруднено; оба эти олигонуклеотида реагируют в заметной степени. Основание X может алкилироваться по карбоксильной группе. Оба эти олигонуклеотида находятся в дополнительной петле тРНК<sup>Phe</sup> (G<sub>44</sub> и X<sub>47</sub>). В положении 26 дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> находится гуанозин m<sub>2</sub><sup>2</sup>G<sub>26</sub>, образующий водородные связи с аденозином A<sub>14</sub>. В тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) в положениях 26 и 44 находятся аденозин и гуанозин соответственно, по-видимому также образующие

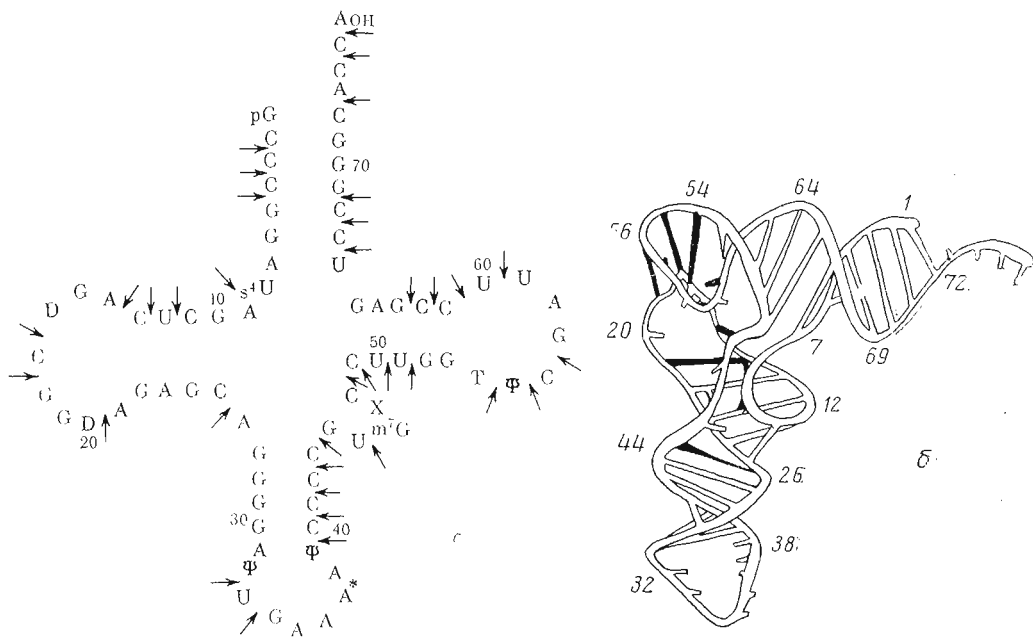


Рис. 2. Структура тРНК<sup>Phe</sup>: а — из *E. coli* [24] (стрелками указаны места расщепления панкреатической РНКазой); б — из дрожжей [4]

водородные связи. Однако N-7-атом гуанозина в этом взаимодействии участвовать не должен. Роль основания X и его взаимодействия в структуре тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) неясны.

Одним из потенциально реакционноспособных центров в структуре тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) является 4-тиоуридин s<sup>4</sup>U<sub>8</sub>. В дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> находящийся в аналогичном положении уридин U<sub>8</sub> образует водородные связи с аденозином A<sub>14</sub> по обратной схеме Хугстина [4]. Такое взаимодействие, возможно, имеет место и в случае тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*); атом серы s<sup>4</sup>U<sub>8</sub> при этом должен оставаться свободным и экспонированным в структуре тРНК. Реакционная способность этого нуклеозида в нативной структуре тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) низка, по-видимому, вследствие взаимодействия его с ионом магния [10]. При изучении взаимодействия дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> с ионами марганца и кобальта было найдено, что во взаимодействии с ними участвуют N-7 гуанозина-15 и O-4 уридина-8 [10]. Вероятно, в растворе реализуется взаимодействие ионов магния с этими же нуклеозидами.

Сильно различаются по реакционной способности остатки гуанозина: D- и T- ветвей тРНК<sup>Phe</sup>. Это не удивительно, так как многие из них участвуют в различных взаимодействиях с нуклеозидами других фрагментов структуры тРНК, причем иногда при этом заполняется широкий желобок спиральных участков тРНК. В области «кармана», образованного D- и T-петлями, находится место прочного связывания катионов [10, 14].

G<sub>15</sub> реагирует с МерУРСI с малой скоростью, вероятно, за счет взаимодействия с ионом магния. Находящийся в аналогичном положении в тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> дрожжей остаток гуанозина также обладает низкой реакционной способностью по отношению к МерУРСI [1, 2]. G<sub>57</sub>, находящийся в T-петле тРНК<sup>Phe</sup>, алкилируется также с низкой скоростью. В дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> атом N-7 гуанозина G<sub>57</sub> образует водородную связь с 2'-ОН-группой рибозы 55.

Практически нереакционноспособным оказался нуклеозид G<sub>53</sub>. Данных о его взаимодействиях с другими нуклеозидами помимо комплементарного взаимодействия с цитидином-61 (в дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup>) не-

имеется. Низкую реакционную способность  $G_{53}$  можно объяснить пространственной экранированностью или координацией с ионом магния. Расположенный в том же положении в структуре тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> остаток гуанозина реагирует с МерУРСI с малой скоростью [1, 2].

Практически не реагирует с МерУРСI остаток гуанозина  $G_{22}$ . В структуре дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> этот нуклеозид образует водородную связь с  $m^7G_{46}$ , причем во взаимодействии участвует его атом N-7. Вероятно, то же взаимодействие происходит в случае тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*). Вблизи этого остатка гуанозина находится место прочного связывания катионов [10, 14]. Реакция по этому остатку гуанозина в условиях, стабилизирующих нативную структуру тРНК, идет лишь в том случае, если алкилирован находящийся вблизи него остаток гуанозина  $G_{24}$ . В пиридил-рибонуклеазном гидролизате модифицированной тРНК<sup>Phe</sup> присутствуют олигонуклеотиды A-G-A-G-Cp, модифицированные либо только по второму остатку гуанозина ( $G_{24}$ ), либо, в малом количестве, по обоим гуанозинам. Отсюда следует, что модификация МерУРСI может изменять структуру тРНК. Так как многие реагенты, применяемые для модификации нуклеиновых кислот, так же как и МерУРСI, содержат гидрофобные группировки или несут заряды, этот случай показывает, насколько важно проводить реакцию на малую глубину для того, чтобы картина не была искажена за счет эффектов изменения структуры полимера по ходу реакции в результате модификации его нуклеозидов.

Неожиданной оказалась повышенная реакционная способность остатков гуанозина  $G_{52}$ ,  $G_{24}$  и  $G_{10}$  (*T*- и *D*-стебли тРНК<sup>Phe</sup>), которая превосходила реакционную способность гуанозинов в одноцепочечных экспонированных участках тРНК<sup>Phe</sup>. В дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> атом O-6 гуанозина  $G_{10}$  образует водородную связь с атомом N-2 гуанозина  $G_{45}$ . В тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) в положении 45 находится уридин, и этого взаимодействия не может быть.

Ранее нами было найдено, что реакционная способность 5'-концевого фосфата тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> по отношению к МерУРСI близка к реакционной способности гуанозина. Олигонуклеотид pG-Cp, получающийся при гидролизе алкилированной тРНК<sup>Phe</sup>, по хроматографическим свойствам близок к модифицированным олигонуклеотидам G-G-Tr и G-G-Dp, и его от них не удалось отделить. Исходя из точности определения нуклеотидного состава модифицированных олигонуклеотидов, можно оценить лишь верхний предел реакционной способности фосфата  $k < 4M^{-1}$ .

Чтобы исследовать природу различий в реакционной способности остатков гуанозина тРНК<sup>Phe</sup> и оценить стабильность различных областей структуры тРНК<sup>Phe</sup>, мы провели модификацию тРНК<sup>Phe</sup> в условиях, когда основные элементы ее третичной структуры разрушены — в отсутствие ионов магния. В этих условиях (0,1 М NaClO<sub>4</sub>,  $5 \cdot 10^{-4}$  М EDTA; 0,03 М Трис-ClO<sub>4</sub>, pH 7,7) тРНК имеют структуру развернутого клеверного листа [5—7]. Кроме того, были проведены опыты по алкилированию тРНК<sup>Phe</sup> в условиях, когда частично расплавлена ее вторичная структура — в отсутствие ионов магния при низкой ионной силе (в 0,03 М Трис-ClO<sub>4</sub>;  $5 \cdot 10^{-4}$  М EDTA). Данные по модификации тРНК<sup>Phe</sup> в этих условиях также приведены в табл. 1. Видно, что в условиях разрушения третичной структуры тРНК и далее, при плавлении ее вторичной структуры, реакционная способность остатков гуанозина в составе тРНК растет. Общее увеличение реакционной способности при этом объясняется удалением из раствора солей, что благоприятно сказывается на реакции цвиттериона, реакционноспособной формы МерУРСI, с полианионом тРНК [15]. При разрушении макроструктуры тРНК различия в реакционной способности ее остатков гуанозина сглаживаются. Максимальный эффект наблюдается в случае гуанозинов, вовлеченных в формирование третичной структуры тРНК, в соответствии с тем, что наличие вторичной структуры не должно

решающим образом сказываться на реакции алкилирования. При разрушении третичной структуры тРНК<sup>Phe</sup> наиболее резко возрастает реакционная способность нуклеозидов G<sub>53</sub>, G<sub>57</sub>, G<sub>15</sub>, s<sup>4</sup>U<sub>8</sub>; существенно возрастает реакционная способность гуанозина G<sub>22</sub>. В дальнейшем, при частичном разрушении вторичной структуры тРНК<sup>Phe</sup>, реакционная способность этих нуклеозидов растет незначительно.

Достоверно уменьшается при разрушении третичной структуры тРНК реакционная способность остатков G<sub>10</sub> и G<sub>24</sub>. Это указывает на то, что в нативной структуре тРНК<sup>Phe</sup> эти нуклеозиды находятся в условиях, благоприятствующих реакции с MerURCl. В принципе такие условия могут быть созданы при локальном увеличении отрицательного заряда за счет сближения нескольких фосфатных групп вблизи этих нуклеозидов, не защищенных ионами магния со стороны оснований G<sub>10</sub> и G<sub>24</sub>. Возможно, что окружение нуклеозидов G<sub>10</sub> и G<sub>24</sub> способствует специфичной адсорбции реагента MerURCl, который содержит как положительно заряженный реакционноспособный центр, так и гидрофобный остаток. Атомы азота N-7 гуанозинов G<sub>10</sub> и G<sub>24</sub> находятся рядом в центральной части L-образной структуры тРНК<sup>Phe</sup>. Ранее нами было найдено, что G<sub>24</sub> в тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) экранируется от MerURCl при образовании комплекса с фенилаланил-тРНК-синтетазой [16]. Имеются многочисленные данные, свидетельствующие о взаимодействии этого участка тРНК<sup>Phe</sup> с фенилаланил-тРНК-синтетазой [4].

Реакционная способность остатков гуанозина в спирализованных участках тРНК<sup>Phe</sup> (G<sub>69-71</sub>, G<sub>27-30</sub>, G<sub>1</sub>) равномерно нарастает при последовательном разрушении макроструктуры полимера. Реакционная способность гуанозина G<sub>1</sub> при удалении солей из раствора увеличивается более резко, чем у других нуклеозидов спирализованных участков тРНК<sup>Phe</sup>. Вероятно, это результат плавления акцепторного стебля тРНК<sup>Phe</sup>. Таким образом, удаление ионов Mg<sup>2+</sup> из раствора не приводит к резкому увеличению реакционной способности нуклеозидов спирализованных участков структуры тРНК и, следовательно, сниженная реакционная способность гуанозинов в этих областях тРНК<sup>Phe</sup> обусловлена высоким «стэкингом» этих областей, а не координацией ионов Mg<sup>2+</sup>.

При хроматографии не удается разделить олигонуклеотиды, содержащие модифицированные остатки гуанозина-63 и -5, а также -65 и -6. Возможно лишь получение усредненных величин реакционной способности G<sub>5</sub> и G<sub>63</sub>, а также G<sub>6</sub> и G<sub>65</sub>, которая относительно резко возрастает при разрушении третичной структуры тРНК, по-видимому, в основном за счет модификации нуклеозидов G<sub>63</sub> и G<sub>65</sub>, расположенных в T-стебле тРНК, так как именно в этой области наблюдаются максимальные изменения структуры.

Как и следовало ожидать, реакционная способность остатков гуанозина, расположенных в экспонированных одноцепочечных участках тРНК<sup>Phe</sup>, мало изменяется при разрушении ее макроструктуры (G<sub>34</sub> в петле антикодона, G<sub>18</sub> и G<sub>19</sub> в D-петле).

В препаратах тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) всегда имеются тРНК<sup>Phe</sup>, содержащие ковалентно связанные нуклеозиды в 8-м и 13-м положениях в результате фотоиндуцируемой реакции между s<sup>4</sup>U<sub>8</sub> и C<sub>13</sub> [17]. Среди олигонуклеотидов, получающихся при гидролизе тРНК<sup>Phe</sup> панкреатической РНКазой, имеется дополнительный олигонуклеотид, образующийся из «сшитой» части тРНК<sup>Phe</sup> GGAUр — Ср. Так как в тРНК<sup>Phe</sup>, содержащей ковалентную связь между 8-м и 13-м нуклеотидами, этот участок ее структуры фиксирован, изменений реакционной способности входящих в нее гуанозинов G<sub>5</sub> и G<sub>6</sub> в условиях, когда макроструктура обычных тРНК разрушается (табл. 1), не наблюдается.

Полученные результаты показывают, что применение алкилирующих реагентов для модификации тРНК и исследование реакции алкилирования с использованием кинетического подхода — оценка реакционной способ-

ности отдельных нуклеозидов — позволяют получить интересную информацию о структуре полинуклеотида. При исследовании модификации тРНК<sup>Phe</sup> в условиях стабильности ее макроструктуры в ряде случаев удается прямо связать реакционную способность ее нуклеотидов с их участием во взаимодействиях, обеспечивающих формирование макроструктуры тРНК, обнаруженных с помощью рентгеноструктурного анализа. Дрожжевая тРНК<sup>Phe</sup> и тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) относятся к одному классу, и можно было ожидать, что такие основные элементы макроструктуры, как взаимодействия гуанозинов G<sub>22</sub>, G<sub>57</sub> и G<sub>15</sub>, одинаковы в обеих тРНК. Действительно, в экспериментах по алкилированию тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) было обнаружено, что эти нуклеозиды обладают пониженной реакционной способностью. Эти данные показывают, что в растворе реализуются те же взаимодействия гуанозинов G<sub>22</sub>, G<sub>57</sub>, G<sub>15</sub>, что и в кристаллической структуре тРНК. Обнаружено, что реакционная способность остатков гуанозина, находящихся в спирализованных областях структуры тРНК, может различаться и быть как выше, так и ниже реакционной способности гуанозинов в одноцепочечных экспонированных участках тРНК<sup>Phe</sup>. Данные о влиянии изменения солевых концентраций при реакции свидетельствуют о том, что снижение реакционной способности гуанозинов в двуспиральных участках тРНК не является результатом взаимодействия с ионами Mg<sup>2+</sup>, а, по-видимому, обусловлено «стэкинг»-взаимодействиями.

На уровне исследования алкилирования индивидуальных остатков гуанозина G<sub>22</sub> и G<sub>24</sub> показано, что модификация отдельных нуклеозидов может приводить к изменениям макроструктуры тРНК, что влечет за собой модификацию нуклеозидов, не реагирующих в нативном полимере.

Интересно, что реакционная способность гуанозина G<sub>22</sub> остается сниженной по сравнению с реакционной способностью других остатков гуанозина при модификации тРНК в растворе с низкой ионной силой, что свидетельствует о сохранении одного из элементов третичной структуры тРНК — взаимодействия G<sub>22</sub>-m<sup>7</sup>G<sub>46</sub> — в условиях, когда частично разрушается вторичная структура тРНК. Это же взаимодействие в структуре дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> в растворе было зарегистрировано методом химических модификаций ранее Цахау с сотр. [18]. Ими было показано, что в дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> имеется электростатическое взаимодействие между m<sup>7</sup>G<sub>46</sub> и фосфатом-9, дополнительно фиксирующее m<sup>7</sup>G вблизи D-стебля тРНК. Поэтому снижение ионной силы раствора не приводит к нарушению этого взаимодействия, а, наоборот, усиливает его.

Разработанный подход к исследованию макроструктуры тРНК в растворе может быть применен для исследования таких вопросов, как изменение структуры тРНК в результате аминокислотирования, взаимодействия с мРНК и рибосомами, а также для изучения различий в структуре нативных и «денатурированных» тРНК.

### Экспериментальная часть

тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli* MRE-600 — препарат фирмы Boehringer, Mannheim (ФРГ), не менее 90% чистоты по акцепторной активности.

Алкилирующий реагент 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиден]-уридин-5'-метилфосфат (MerURCl) был синтезирован в лаборатории химии нуклеиновых кислот НИОХ Г. Г. Карповой [19]. Содержание основного вещества в препарате MerURCl > 94%. Концентрацию реагента определяли по оптической плотности раствора после гидролиза ацетальной связи при pH 2,0 в течение 1 ч при комнатной температуре, исходя из мольного коэффициента экстинкции  $\epsilon_{350} 28,8 \cdot 10^3$  [20, 21].

Использовали панкреатическую РНКазу (Worthington, США), T1- и T2-РНКазы (Sankyo Co, Япония), DEAE-целлюлозу DEAE 23 SS (Serva, ФРГ). Применяли ионообменник (LKB, Швеция), аналог дауэкса



1 × 8, с диаметром гранул  $12 \pm 2$  мкм, любезно предоставленный д-ром Л. Арлингером, и ионообменник Partisil 10 SAX (Reeve Angels, Англия). Все остальные реактивы были марки х. ч. или ос. ч.

Алкилирование тРНК<sup>Phe</sup> реагентом МерURCl проводили во влажной камере при 37° в следующих условиях: а) 0,03 М Трис-НСlO<sub>4</sub>, рН 7,7; 0,1 М NaClO<sub>4</sub>; 5,8 мМ Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; б) 0,03 М Трис-НСlO<sub>4</sub>, рН 7,7; 0,1 М NaClO<sub>4</sub>; в) 0,03 М Трис-НСlO<sub>4</sub>, рН 7,7.

В каждом случае реакционная смесь содержала 36—41 мкМ тРНК<sup>Phe</sup>; 18,5 мМ МерURCl и 0,5 мМ EDTA. По окончании реакции к смеси добавляли 1/4 объема 5 М NaCl и тРНК<sup>Phe</sup> осаждали этанолом. Осадок модифицированной тРНК<sup>Phe</sup> дважды переосаждали этанолом из 0,2 М NaCl, 0,05 М ацетата натрия, рН 5,0. Гидролиз ацетальных связей в модифицированной тРНК<sup>Phe</sup> проводили 40 мин в 0,05 М ацетате натрия, рН 4,0, при 40° [1,21], после чего тРНК<sup>Phe</sup> осаждали этанолом, переосаждали из 0,2 М NaCl, 0,05 М ацетата натрия, рН 5,0, промывали этанолом и сушили над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> в вакууме.

Степень модификации тРНК<sup>Phe</sup> определяли по поглощению раствора модифицированной тРНК<sup>Phe</sup> при 260 и 350 нм. Молярный коэффициент экстинкции ( $\epsilon$ ) бензальдегидной группы в составе тРНК при 350 нм  $23,8 \cdot 10^3$  [22, 23]. Молярный коэффициент экстинкции тРНК<sup>Phe</sup>  $\epsilon_{260}$  принимали равным  $6,3 \cdot 10^5$ , исходя из нуклеотидного состава тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli* [24], экстинкции нуклеотидов при 260 нм [25] и степени гиперхромизма тРНК<sup>Phe</sup> 24% [26].

Гидролиз модифицированной тРНК<sup>Phe</sup> панкреатической РНКазой проводили 4 ч в 0,01 М Трис-НСl-буфере, рН 7,7, при 37°. Проба объемом 100 мкл содержала 0,63—0,73 ОЕ<sub>260</sub> тРНК<sup>Phe</sup> и 1,25 мкг РНКазы.

Все хроматографические процедуры выполнены в микроколоночном варианте на микроспектрофотометре МСФП-3 [27—28]. Методы разделения олигонуклеотидов в микромасштабе описаны нами ранее [27, 28].

Олигонуклеотиды пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК<sup>Phe</sup>, модифицированной МерURCl, первоначально хроматографировали на DEAE-целлюлозе (в Cl<sup>-</sup>форме) при рН 8,2 в 0,02 М Трис-НСl-буфере, 7 М мочевины в линейном градиенте концентрации NaCl 0—0,32 М. В этих условиях заряжены только фосфатные группы олигонуклеотидов, а модифицированные остатки гуанозина существуют в виде цвиттерионов [9], поэтому осуществляется разделение олигонуклеотидов по длине. В процессе хроматографии непрерывно регистрировали оптическую плотность элюата на длинах волн 260, 290, 330, 350, 380 нм. Модифицированные олигонуклеотиды поглощают свет в области 350 нм и легко регистрируются в процессе хроматографии. Результаты хроматографии представлены на рис. 1а.

Фракции модифицированных олигонуклеотидов 1, 2, 3, 4, соответствующие ди-, три-, тетра- и пента- + гексануклеотидам, собирали и рехроматографировали на DEAE-целлюлозе при рН 3,7 (рН доводили HCOOH) в 7 М мочевины в градиенте концентрации NaCl: динуклеотиды (1) — 0—0,07 М; тринуклеотиды (2) — 0—0,11 М; тетрануклеотиды (3) — 0—0,13 М; пента + гексануклеотиды (4) — 0—0,22 М (рис. 1б—д). В этих условиях ионизуются гетероциклические основания олигонуклеотидов, а модифицированные остатки гуанозина несут положительный заряд, что позволяет провести разделение олигонуклеотидов, различающихся по составу оснований. Положение каждого из фрагментов тРНК<sup>Phe</sup> на кривой хроматографического разделения в данных условиях определяется их зарядами, которые могут быть рассчитаны исходя из констант ионизации составляющих нуклеотидов.

В результате хроматографического разделения удается выделить индивидуальные следующие модифицированные олигонуклеотиды: A-(3G, G̃)-A-фр, m<sup>7</sup>G-X̃-Cp, G̃-Up, (G, 2G)-Cp, G-G-A-s<sup>4</sup>Up, A-G-A-G̃-Cp, A-G-A-G̃-Cp, G̃-A-A-s<sup>2</sup>i<sup>0</sup>A-A-фр, (G̃,G)-A-Up-Cp (в последнем случае

Идентификация олигонуклеотидов пиримидил-РНКазного гидролизата ТРНК<sup>Phe</sup>  
*E. coli*, модифицированной МерУРС1

Фрагмент	Структура олигонуклеотида	Выделение *	Нуклеотидный состав
1.1	m <sup>7</sup> G <sup>*</sup> X <sub>47</sub> Cr	I, II	Идентифицирован по хроматографическому поведению
1.2	G <sub>44</sub> Uр	»	G <sup>*</sup> р : Uр = 1,0 : 1,1
2.1.1	G <sup>*</sup> G <sub>53</sub> Tr	I, II, III, I	G <sup>*</sup> р : Tr = 2,0 : 0,65
2.1.2	G <sup>*</sup> G <sub>18</sub> Dp	»	G <sup>*</sup> р
2.1.3	AG <sub>10</sub> Cr	»	G <sup>*</sup> р : Ap : Cr = 1,0 : 1,2 : 1,2
2.2.1	AG <sub>15</sub> Dp	»	G <sup>*</sup> р : Ap = 1,0 : 0,9
2.2.2	G <sub>57</sub> AUр	»	G <sup>*</sup> р : Ap : Uр = 1,0 : 1,2 : 1,0
2.3.1	G <sup>*</sup> G <sub>53</sub> Tr	»	G <sup>*</sup> р : Cr : Tr = 1,0 : 1,0 : 0,6
	G <sup>*</sup> G <sub>18</sub> Dp		
2.3.2	G <sub>62</sub> GTr	»	G <sup>*</sup> р : Cr : Tr = 0,7 : 1,0 : 0,5
	G <sub>18</sub> GDP		
3.2	(2G, G)Cr	I, II	G <sup>*</sup> р : Cr : Cr = 0,9 : 2,0 : 0,7
3.4	GGAs <sup>4</sup> Uр	»	Gр : Ap : Uр = 2,3 : 1,0 : 0,6
3.1.1	pG <sub>1</sub> Cr	I, II, III, II	pG <sup>*</sup> р : Cr = 1,0 : 0,7
3.3.1	G <sup>*</sup> G <sub>6</sub> As <sup>4</sup> Uр	»	G <sup>*</sup> р : Ap : Uр : Gр = 1,0 : 0,9 : 0,8 : 1,1
	GA <sup>*</sup> G <sub>65</sub> Uр		
3.3.2	G <sub>5</sub> GAAs <sup>4</sup> Uр	»	G <sup>*</sup> р : Ap : Uр : Cr = 0,8 : 1,0 : 0,7 : 1,1
	G <sub>63</sub> AGUр		
4.1	AG <sub>22</sub> AG <sub>24</sub> Cr	I, II	G <sup>*</sup> р : Ap : Cr = 1,8 : 2,0 : 0,8
4.2	AGA <sup>*</sup> G <sub>24</sub> Cr	»	T1 РНКазы : (G <sup>*</sup> р : Ap : Cr = 1,0 : 1,0 : 0,9) + + (Gр : Ap = 1,0 : 1,2)
4.3	G <sub>34</sub> AAAs <sup>2i6</sup> AAψр	»	G <sup>*</sup> р : Ap : ψр = 1,0 : 1,9 : 0,8 (+ s <sup>2i6</sup> AAр, устойчив к действию T2 РНКазы)
4.4	(G, G <sub>6</sub> )AUр-Cр	»	G <sup>*</sup> р : Cr : Ap = 0,9 : 1,2 : 1,0 (+ неидентифицированные компоненты, поглощающие свет при 330 нм)
5	A(G, 3G)Aψр	I	Идентифицирован по хроматографическому поведению

\* I — хроматография на DEAE-целлюлозе при pH 8,5; II — хроматография на DEAE-целлюлозе при pH 3,7; III — хроматографии на Partisil 10 SAX при pH 3,7.

ковалентная сшивка 4-тиоуридина с C<sub>13</sub>). Вследствие трудности определения степени модификации m<sup>7</sup>G-X-Cр, связанной с тем, что модифицированный m<sup>7</sup>G-X-Cр элюируется с колонки острым пиком и площадь этого пика трудно точно измерить, X<sub>47</sub> и G<sub>44</sub> рассматриваются в табл. 1 вместе по данным хроматографии 1а, пик 1.

Фракции 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.3 были неомогенны и дополнительно рехроматографировались на ионообменнике Partisil 10 SAX при pH 3,7, в 7 М мочеvine в градиенте концентрации NaCl. После этой стадии разделения удается выделить индивидуальные AG<sup>\*</sup>Cr (рис. 1e), AG<sup>\*</sup>Dp и GAUр (рис. 1ж), pG-Cр (рис. 1з).

Для идентификации олигонуклеотидов определяли их нуклеотидный состав (табл. 2). Олигонуклеотиды обессоливали на колонке с сефадексом G-10 и гидролизovali T1-РНКазой и T2-РНКазой.

Гидролиз T1-РНКазой проводили в 0,01 М Трис-НСI-буфере, рН 7,7. В пробу объемом 180—200 мкл вносили T1-РНКазу из расчета 4 ед. активности на 0,01 ОЕ<sub>260</sub> олигонуклеотида и инкубировали 2 ч при 37° во влажной камере. Продукты T1-гидролиза хроматографировали на DEAE-целлюлозе (в СI-форме) при рН 8,2 так же, как олигонуклеотиды пиримидил-РНКазного гидролизата тРНК<sup>Phc</sup>.

Гидролиз олигонуклеотидов T2-РНКазой проводили 1 ч в объеме 150 мкл в 0,01 М ацетате натрия, рН 4,6, в присутствии 40 ед. T2-РНКазы при комнатной температуре. По окончании инкубации рН раствора доводили раствором аммиака до 8,0—8,5 и смесь разбавляли в 2—3 раза. Полученные мононуклеотиды хроматографировали на ионообменнике фирмы LKB типа дауэкс 1 × 8 в НСОО-форме в линейном градиенте концентрации формиата аммония от 0,01 до 1,4 М при рН 4,2. Следует отметить, что при нанесении нуклеотидов на колонку в щелочной среде частично происходит раскрытие имидазольного цикла алкилированного гуанозина (на 30—80 %).

Нуклеотидные составы обоих пиков на рис. 1*u* совпадали друг с другом: оба содержали  $\overset{\ast}{G}p$ ,  $Gp$  и  $Tr$ . Аналогичные результаты были получены при сравнении нуклеотидных составов пиков на рис. 1*к*. На основании этого, а также принимая во внимание результаты разделения олигонуклеотидов  $\overset{\ast}{A}GDr$  и  $\overset{\ast}{G}AUr$  был сделан вывод, что на ионообменнике Partisil 10 SAX хроматографическая подвижность олигонуклеотида зависит от положения модифицированного остатка гуанозина: модифицированные в среднее положение цепи олигонуклеотиды элюируются раньше, чем олигонуклеотиды, модифицированные в крайние положения. Поэтому модификации  $G_{63}$  и  $G_5$  рассматриваются в табл. 1 вместе, так же как  $G_{65}$  и  $G_6$ .

Однократно модифицированный пентануклеотид AGAGCp (рис. 1*д*) имел модифицированным только остаток  $G_{24}$ , что было показано анализом T1-РНКазного гидролизата этого олигонуклеотида (T1-РНКаза не способна расщеплять фосфодиэфирные связи модифицированных остатков гуанозина [29]). Этот гидролизат содержал только модифицированный три-нуклеотид  $\overset{\ast}{A}GCp$  и немодифицированный динуклеотид  $\overset{\ast}{A}Gp$ . Модифицированный  $G_{22}$  присутствует только в сочетании с модифицированным  $G_{34}$  в составе дважды модифицированного пентануклеотида (рис. 1*д*, пик 4.1).

Пик 4.4 (рис. 1*д*) с повышенным поглощением света при 330 нм был идентифицирован по хроматографическим свойствам на DEAE-целлюлозе при рН 8,2 и 3,7, а также на основании нуклеотидного состава как ковалентно связанный модифицированный тетра-нуклеотид  $(\overset{\ast}{G}G)A-s^4Ur$  и Cp [30].

Степени модификации отдельных олигонуклеотидов тРНК<sup>Phc</sup> рассчитывали пропорционально площадям соответствующих хроматографических пиков ( $\lambda$  350 нм) методом взвешивания, исходя из общей степени модификации тРНК<sup>Phc</sup> (в молях реагента на моль тРНК<sup>Phc</sup>).

Относительные константы скорости модификации  $k_j$  М<sup>-1</sup> для отдельных остатков гуанозина  $G_j$  в тРНК<sup>Phc</sup> ( $j$  — порядковый номер остатка гуанозина в первичной структуре тРНК<sup>Phc</sup>) рассчитывали согласно [2] по уравнению

$$k_j = \frac{k_G^j}{\sum_i k_i [N_i]} = \frac{[MepUR-G_j]}{\{[MepURCl]_0 \cdot (1 - e^{-k_0 t}) - [MepUR-tPHK]\}} \cdot \frac{1}{[G_j]}$$

где  $k_0$  — константа скорости ионизации MepURCl ( $k_0 = 7,73 \cdot 10^{-5}$  с<sup>-1</sup> при 37°);  $k_G^j$  — константа скорости реакции MepUR<sup>+</sup> (активный проме-

жutoчный этилениммониевый катион, образованный из  $\text{MerURCl}$  с гуанозином  $G_j$ ;  $k_i$  — константы скоростей для побочных реакций  $\text{MerUR}^+$  с низкомолекулярными нуклеофилами. Концентрации низкомолекулярных нуклеофилов  $[N_i]$  были одинаковы во всех экспериментах;  $[\text{MerUR-G}_j]$  — концентрация модифицированного остатка гуанозина  $G_j$  (это значение можно получить из концентрации реагента, присоединившегося к полимеру —  $[\text{MerUR-tPHK}]$ , и из отношения  $[\text{MerUR-G}_j]/[\text{MerUR-tPHK}]$ , определяемого хроматографическим анализом);  $[\text{MerURCl}]_0$  — начальная концентрация реагента;  $[G_j]$  равна молярной концентрации  $\text{tPHK}^{\text{Phe}}$ . Ошибка в определении величин  $k$  не более 10%.

Авторы выражают благодарность Г. Г. Карповой (Новосибирский институт органической химии СО АН СССР) за синтез алкилирующего реагента.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Vlassov V. V., Grineva N. I., Knorre D. G. (1972) FEBS Lett., 20, 66—70.
- Власов В. В., Кнорре Д. Г. (1974) Молекулярн. биол., 8, 234—243.
- Vlassov V. V., Grineva N. I., Knorre D. G., Pavlova R. M. (1972) FEBS Lett., 28, 322—324.
- Rich A., RajBhandary U. L. (1976) Ann. Rev. Biochem., 45, 805—860.
- Goldstein R. N., Stefanovic S., Kallenbach N. R. (1972) J. Mol. Biol., 69, 217—236.
- Filimonov V. V., Privalov P. L., Hinz H.-J., von der Haar F., Cramer F. (1976) Eur. J. Biochem., 70, 25—32.
- Cole P. E., Yang S. K., Crothers D. M. (1972) Biochemistry, 11, 4358—4368.
- Беликова А. М., Гринева Н. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 5, 119—124.
- Lawley P. D. (1966) Prog. Nucleic Acids Res. and Mol. Biol., 5, 89—121.
- Jack A., Ladner J. E., Rhodes D., Brown R. S., Klug A. (1977) J. Mol. Biol., 111, 315—328.
- Пюльман А., Пюльман Б. (1965) Квантовая биохимия, с. 177—182, «Мир», М.
- Litt M. (1969) Biochemistry, 8, 3249—3253.
- Грачев М. А. (1972) Канд. дис. «Структурно-функциональное исследование валминовой тРНК», М.
- Robertus J. D., Ladner J. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R. S., Clark V. F. C., Klug A. (1974) Nature, 250, 546—551.
- Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1974) Докл. АН СССР, 201, 609—611.
- Ankilova V. N., Vlassov V. V., Knorre D. G., Melamed N. V., Nuzdihna N. A. (1975) FEBS Lett., 60, 168—171.
- Singhal R. P., Best A. N. (1973) Biochem. et biophys. acta, 331, 357—366.
- Wintermeyer W., Zachau H. G. (1975) FEBS Lett., 58, 306—311.
- Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1970) Ж. общ. хим., 40, 215—221.
- Беликова А. М., Гринева Н. И. (1966) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 3, 79—86.
- Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1970) Молекулярн. биол., 4, 201—204.
- Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Теплова Н. М. (1970) Молекулярн. биол., 4, 30—36.
- Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. (1969) Молекулярн. биол., 3, 210—220.
- Barrell V. G., Clark V. F. C. (1974) Handbook of Nucleic Acid Sequences, Joynson-Bruvverst Ltd, Oxford.
- Schwarzmann Radiochemical-Biochemical Catalog (1970) New York.†
- Trifunac N. P., Krasna A. I. (1974) Biochemistry, 13, 2403—2409.
- Власов В. В., Грачев М. А., Комарова Н. И., Кузьмин С. В., Меизорова Н. И. (1972) Молекулярн. биол., 6, 809—816.
- Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В. (1973) Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот, «Наука», М.
- Власов В. В., Грачев М. А., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. (1973) Молекулярн. биол., 7, 12—18.
- Bergstrom D. E., Leonard N. J. (1972) Biochemistry, 11, 1—18.

Поступила в редакцию  
20.VII.1977

После доработки  
12.VIII.1977

CHEMICAL MODIFICATION STUDY ON THE MACROSTRUCTURE OF tRNA<sup>Phe</sup>  
(*E. COLI*)

VLASSOV V. V., SKOBELTSYNA L. M.

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

Alkylation of tRNA<sup>Phe</sup> (*E.coli*) with the derivative of 2-chloroethylamine 2',3'-O-[4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylidene]-uridine-5'-methylphosphate (MepURCl) was studied. Quantitative characteristics of reactivities of guanosines of this tRNA under various conditions were obtained. The results are discussed in terms of tertiary structure of this tRNA. Guanosine residues participating in hydrogen bonding, by their N7 atoms (G<sub>22</sub>, G<sub>37</sub>) and nucleosides interacting with magnesium ions (G<sub>15</sub>, s<sup>4</sup>U<sub>8</sub>) are the less reactive toward the alkylating reagent MepURCl. Destruction of the tRNA<sup>Phe</sup> tertiary structure leads to a significant increase in the reactivities of these nucleosides. Reactivities of guanosine residues in helical regions of tRNA<sup>Phe</sup> differ, probably due to the stacking interactions. Guanosine residues G<sub>10</sub> and G<sub>21</sub> are characterized by abnormally high reactivities. Therefore, determination of reactivities of guanosine residues toward alkylating reagents may serve as a sensitive test for conformational changes in tRNA.

---