



УДК 547.963.32.04:547.455.522'118.04

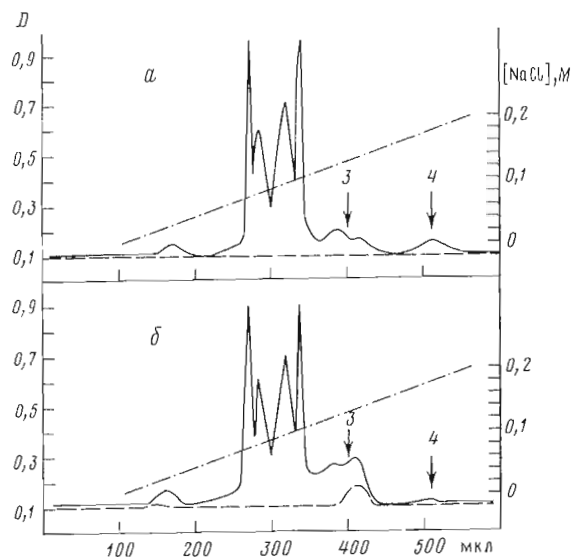
ИЗБИРАТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ 5'-КОНЦЕВЫХ
ФОСФАТНЫХ ГРУПП ТРАНСПОРТНЫХ И РИБОСОМНЫХ РНК*Мочалова Л. В., Шатский И. И., Богданов А. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Описана модификация 5'-концевых фосфатных групп природных нуклеиновых кислот — тРНК и 16S рРНК. На примере тРНК показано, что реакция протекает высокоспецифично и с высоким выходом. 16S рРНК после модификации сохраняет способность к реконструкции с рибосомными белками, приводящей к образованию 30S субчастиц рибосом.

Избирательная модификация концевых нуклеотидных остатков РНК в последнее время широко используется при изучении их макромолекулярной организации, а также для адресной модификации функционально важных участков нуклеопротеидных комплексов [1—5]. Наличие 3'-концевой *цис*-гликольной группы рибозы в молекулах РНК позволяет легко и селективно модифицировать этот участок молекулы, не затрагивая межнуклеотидных связей и гетероциклических оснований. Задача избирательной модификации 5'-концевых остатков РНК оказалась гораздо более сложной. Действительно, 5'-концевая фосфомоноэфирная группа лишь незначительно отличается по реакционной способности от фосфатных остатков, образующих межнуклеотидные связи, а большинство применяемых в нуклеотидной химии конденсирующих агентов не является полностью специфичными по отношению к фосфомоноэфирам [6]. С другой стороны, побочные реакции, вызывающие изомеризацию или разрыв фосфодиэфирных связей и затрагивающие хотя бы 1% этих связей, в случае высокополимерных РНК должны приводить к серьезным нарушениям их структуры [7]. Большую трудность при модификации природных РНК по 5'-концу представляет также их низкая растворимость в органических растворителях, обычно используемых в нуклеотидной химии.

Недавно Мишениной и др. [8] был предложен метод синтеза 5'-фосфамидов олигонуклеотидов, который позволяет избежать указанных выше осложнений. Для селективной модификации 5'-фосфатных групп олигонуклеотидов и $\text{pU}(U)$ авторы использовали в качестве конденсирующего агента смесь 2,2'-динитрилдисульфида и трифенилфосфина, а как нуклеофильный субстрат — амин. Авторы обнаружили, что синтез можно проводить не только в абсолютном органическом растворителе, но и в присутствии 10—15% воды.

Взяв за основу этот метод модификации олигонуклеотидов, мы распространили его на высокополимерные природные рибонуклеотиды и показали, что модификация по 5'-концу РНК проходит специфично с высоким выходом. Реакция изучалась на примере суммарной дрожжевой тРНК, в состав которой входит большое количество необычных гетероциклических оснований, перекрывающее весь спектр миноров, встречающихся в высокополимерных РНК. Реакцию проводили в диметилформамиде, содержащем 10% воды, в качестве нуклеофильного агента был выбран 2-(N-2',4'-динитрофениламино)этиламин (Dnp-этилендиамин). Этот амин имеет сравнительно низкое значение $pK(\sim 9)$, что соответствует оптимальным условиям протекания реакции, найденным Кюорре и сотр. [9]. Благодаря его сольбилизирующему действию в реакцию удалось ввести непосредственно Na-соль тРНК. После реакции не было обнаружено деграда-



Профиль элюции гидролизата нативной (а) и модифицированной Dnp-этилендиамином (б) суммарной дрожжевой тРНК после инкубации с РНКазой *P.b.* в течение 4 ч при 50° С. Микроколоночная хроматография на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Теннера [12] в градиенте концентрации NaCl; контроль по поглощению при 260 (сплошная линия) и 360 нм (пунктир). Цифрами 3 и 4 обозначены места выхода 3- и 4-зарядных ионов

ции тРНК (по данным электрофореза в 14% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [10]).

Для исследования степени и избирательности модификации молекулы тРНК был проведен исчерпывающий гидролиз тРНК внеклеточной кислотой РНКазой гриба *Penicillium brevicompactum* (РНКазой *P.b.*). РНКаза *P.b.* избирательно гидролизует 3'→5', но не 2'→5'-фосфодизфирные связи и не специфична по отношению к гетероциклическим основаниям [11]. Гидролизат исследовали микроколоночной хроматографией с анализом поглощения при 260 и 360 нм (максимумы поглощения гетероциклических оснований и Dnp-этилендиамина соответственно). Сопоставление хроматографических профилей (рисунок) гидролизатов исходной тРНК (а) и после ее модификации (б) показало, что в результате реакции практически исчезает поглощение, соответствующее 4-зарядному 5'-концевому нуклеозид-3',5'-дифосфату немодифицированной тРНК (рисунок а, пик 4), а появляется поглощение в той области градиента концентрации NaCl, которая соответствует 3-зарядным ионам (рисунок б, пик 3). В этом же пике появляется поглощение Dnp-группы при 360 нм, что свидетельствует о модификации по 5'-концевому фосфату тРНК. Сравнение площадей пиков 3 и 4 (а, б) позволяет сделать вывод, что степень амидирования по 5'-концевому фосфомоноэфирному остатку составляет не менее 80%.

Мы также исследовали модификацию 5'-конца 16S РНК, которая проводилась по той же схеме, что и модификация тРНК. После окончания реакции полинуклеотидная цепь 16S РНК сохраняла свою целостность (по данным электрофореза в 4% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях) и способность к реконструкции в 30S субчастицы с суммарным белком малой субчастицы с высоким выходом (80–90%). Последнее обстоятельство говорит о том, что в процессе модификации 5'-конца 16S РНК не затрагиваются ее внутренние нуклеотидные звенья, так как химическая модификация всего 6–8 нуклеотидных остатков 16S РНК приводит к полной потере ее способности участвовать в реконструкции 30S субчастиц рибосом [13]. Степень модификации 5'-концевых групп 16S РНК определялась иммунохимически (использовались антитела, специфичные

к Dnp-группам) после включения их в 30S субчастицы. Она составляла 50%.

Таким образом, в настоящей работе впервые проведена модификация 5'-концевой фосфомоноэфирной группы высокополимерной РНК. Полученные производные могут быть использованы для изучения топографии РНК в рибосомах методами иммунной электронной микроскопии и флуоресцентного анализа.

Экспериментальная часть

Электрофорез Dnp-этилендиамина проводили на бумаге FN-1 (Filtrak, ГДР) в 0,1 н. уксусной кислоте. Микроколоночная хроматография на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Теннера [12] была любезно проведена В. Л. Друцей (Межфакультетская проблемная НИЛ им. А. Н. Белозерского, МГУ).

В работе использовали трифенилфосфин (Chemapol, СССР) и 2,2'-дипиридилдисульфид (Мерск, ФРГ). Суммарная дрожжевая тРНК — коммерческий препарат (СКТБ БАВ, Новосибирск), очищенный от примесей РНКаз и высокомолекулярных РНК. РНКазы *P. b.* (КФ 2.77.17) с активностью 390 ед. акт./мг была любезно предоставлена В. Л. Друцей.

16S РНК выделяли из 30S субчастиц методом фенольной депротенизации. Суммарный белок малых субчастиц получали их обработкой раствором 3 М LiCl в 4 М мочевины.

Dnp-этилендиамин. К 50%-ному спиртовому раствору этилендиамина (2 ммоль) при интенсивном перемешивании по каплям добавляли 0,15 М спиртовой раствор 2,4-динитрофторбензола (0,1 ммоль). Смесь инкубировали 1 ч при 37°С, затем 12 ч при 20°С. При добавлении 1,5-кратного объема воды выпадал оранжевый осадок Dnp-этилендиамина, который очищали многократной перекристаллизацией из водно-спиртового раствора. При анализе полученного вещества электрофорезом на бумаге обнаружен единственный продукт, дающий положительную реакцию с нигидрином, и с электрофоретической подвижностью однозарядного катиона. Т. пл. 84°С, что совпадает с литературными данными [14]. Выход 80%.

Амидирование тРНК и 16S рРНК по 5'-концевому фосфату. Для получения Na-соли тРНК и 16S РНК кислоты растворяли в буфере 0,15 М NaCl — 0,01 М EDTA — 0,015 М Na-цитрат, pH 7,0, до концентрации 300—600 ОЕ₂₆₀/мл, диализовали против этого же буфера, но без EDTA 12 ч, затем 3 ч против воды для удаления избытка солей. К Na-соли РНК (3—6 ОЕ₂₆₀) в 10 мкл воды приливали при 5°С 100 мкл раствора Dnp-этилендиамина (5—10 мкмоль) в диметилформамиде. К полученному раствору добавляли по 50 мкмоль 2,2'-дипиридилдисульфида и трифенилфосфина порциями в течение 2 ч при 20°С в темноте. К реакционной смеси добавляли 1—2 мл этилацетата, насыщенного NaClO₄, и после 6-часовой инкубации при -20°С выпавший осадок Na-соли РНК отделяли центрифугированием и несколько раз промывали этилацетатом с NaClO₄ для удаления избытка Dnp-этилендиамина и конденсирующего агента. Выход 80—90% (по поглощению).

Гидролиз нативной и модифицированной тРНК РНКазой P.b. К раствору Na-соли тРНК (2 ОЕ₂₆₀) в 30 мкл 0,2 М ацетата натрия, pH 5,0 добавляли 10 мкл раствора РНКазы *P. b.* (0,5 мг/мл) в том же буфере. Смесь инкубировали 4 ч при 50°С. На микроколоночку с DEAE-целлюлозой наносили 15 мкл разбавленного в 10 раз раствора гидролизата (0,075 ОЕ₂₆₀). Микроколоночную хроматографию проводили на приборе МСФП-3 [12].

Степень модификации 16S РНК определяли после ее включения в состав 30S субчастиц путем реконструкции [15]. Выход реконструированных субчастиц по данным ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы составил 80%. Степень модификации 16S РНК, включенной в состав реконструированных субчастиц, приблизительно оценивали по их способности образовывать димерные комплексы с антителами против Dnp-группы. Условия приготовления и анализа комплексов описаны ранее [2]. Анти-

тела против Днр-группы получены по методике [16]. Степень модификации составляла не менее 50%.

Авторы выражают благодарность В. В. Самукову (СКТБ БАВ, Новосибирск) и В. И. Друце за ценные замечания и интерес к работе, Г. З. Гайде и Н. В. Чичковой за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Olson H., Glitz D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 8, p. 3769–3773.
2. Shatsky I. N., Mochalova L. V., Kojouharova M. S., Bogdanov A. A., Vasiliev V. D. J. Mol. Biol., 1979, v. 133, № 4, p. 501–515.
3. Shatsky I. N., Evstafieva A. G., Bistrova T. F., Bogdanov A. A., Vasiliev V. D. FEBS Lett., 1980, v. 121, № 1, p. 97–100.
4. Shatsky I. N., Evstafieva A. G., Bistrova T. F., Bogdanov A. A., Vasiliev V. D. FEBS Lett., 1980, v. 122, № 2, p. 251–255.
5. Pellegrini M., Cantor C. R. Affinity labeling of ribosomes, in «Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis»/Eds Weissbach H., Pestka S. N. Y.—London: Acad. Press, 1977, p. 203–244.
6. Зарытова В. Ф., Райр В. К., Черникова Т. С. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 12, с. 1626–1632.
7. Druzta V. L., Zaritova V. F., Knorre D. G., Lebedev A. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 1, p. 185–193.
8. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886–894.
9. Кнорре Д. Г., Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Докл. АН СССР, 1977, т. 236, № 3, с. 613–616.
10. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560–564.
11. Лавина Т. В., Безбородова С. И. Биохимия, 1973, т. 38, вып. 4, с. 686–695.
12. Грачев М. А. В кн.: Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот/Ред. Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В. М.: Наука, 1973, с. 104–122.
13. Nomura M., Traub P., Bechmann H. Nature, 1968, v. 219, № 5156, p. 793–799.
14. Patent Société Monsavon — l'Oréal. Brit. 812, 211, Apr. 22, 1959. Chem. Abstr., 1960, v. 54, № 2, p. 1876 (b).
15. Held W. A., Misushima S., Nomura M. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 16, p. 5720–5730.
16. Little R. J., Eisen H. N. In: Methods in Immunology and Immunochemistry/Eds Williams C. A., Chase M. W. N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 1, p. 128–133.

Поступила в редакцию
22.VII.1981

SELECTIVE MODIFICATION OF 5'-TERMINAL PHOSPHATE GROUPS OF TRANSFER AND RIBOSOMAL RNAs

MOCHALOVA L. V., SHATSKY I. N., BOGDANOV A. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A method has been described for amidation of the 5'-terminal phosphate groups of tRNA and 16S rRNA. The mixture of DNP-ethylenediamine and RNA in dimethylformamide: water (9 : 1) has to be treated with an excess of the condensing agent — a mixture of triphenylphosphine and 2,2'-dipyridyl disulfide. The tRNA reaction has been shown to be highly specific and to yield a quantitative amidation of the monosubstituted phosphate. After modification, the 16S rRNA is still intact, being capable of reconstitution with the total 30S ribosomal protein.