

can be overcome using reconstituted Sendai virus envelopes and erythrocyte ghosts as membrane carriers of the oligonucleotide derivatives. Fast methods for incorporation of reactive oligonucleotide derivatives into membrane carriers have been developed. In the model experiments membrane carriers incorporating alkylating oligothymidylate derivatives are delivered into ascite carcinoma Krebs 2 cells and it is shown that they are transferred efficiently into cytosol and react with complementary poly(A) sequences of cellular RNAs. Efficiency of delivery of oligonucleotide reagents into cells 10—100 times increases when using the membrane vehicles.

УДК 577.21

В. А. Вахитов, Ю. М. Никоноров

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БОЛЬШОГО ПОВТОРА 5S ДНК У ДИПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM MONOCOCCUM* L.

Определена нуклеотидная последовательность большой повторяющейся единицы 5S ДНК у диплоидной пшеницы *T. monococtum* протяженностью 485 п. н. Показано, что различия в размерах двух семейств повторов 5S ДНК у данного вида пшеницы связаны с делецией 154 п. н. в центральной области межгенного спейсера. Выявлена высокая гомология областей, кодирующих 5S рРНК, терминирующих последовательностей, 3'-концов межгенных спейсеров в обоих семействах повторов 5S ДНК, а также между повторами одинаковой протяженности у двух образцов *T. monococtum*. Установлено, что в отличие от двудольных растений у изученных видов злаков последовательность АТАТААТТА локализована ближе к 5'-концу межгенного спейсера.

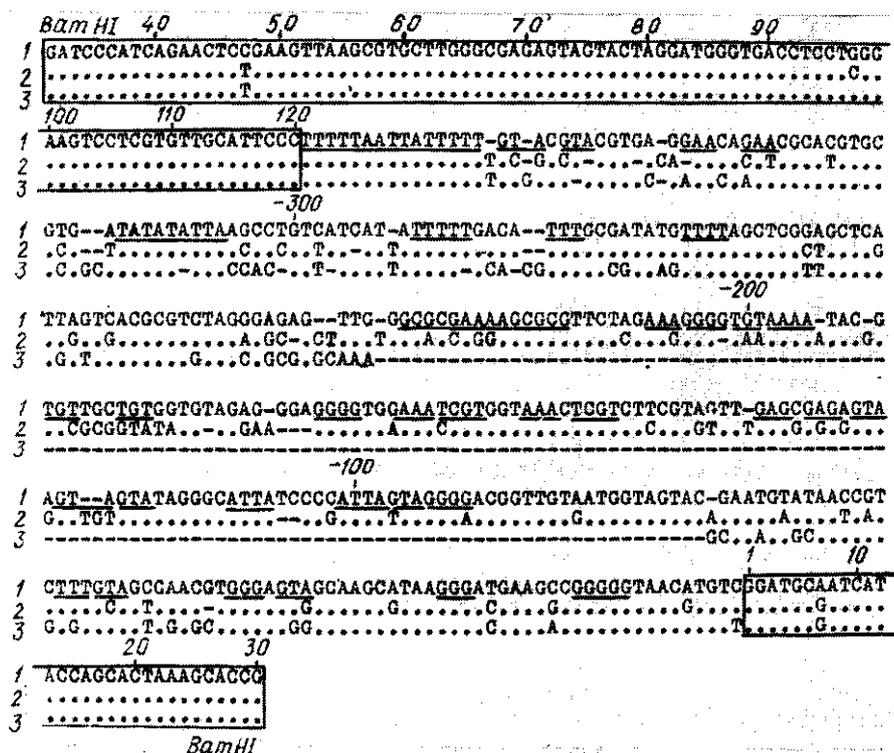
В геноме диплоидной пшеницы *T. monococtum* имеются два семейства повторяющихся последовательностей ДНК, кодирующих 5S рРНК, размерами около 320 и 500 п. н. [1]. Ранее они были клонированы нами в плаزمиде *pTm5S7* и *pTm5S12* и тогда же определена нуклеотидная последовательность малого повтора 5S ДНК [1]. В настоящей работе представлена первичная структура 5S ДНК размером 500 п. н., клонированной в плазмиде *pTm5S12*.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использован диплоидный вид пшеницы *T. monococtum* (номер каталога ВИР — 8555). Методы выделения ДНК рекомбинантных плазмид, включения радиоактивной метки и определения первичной структуры клонированных фрагментов ДНК были подробно описаны нами в предыдущей работе [1].

Результаты и обсуждение. Для определения первичной структуры вставка рекомбинантной плазмиды *pTm5S12*, содержащей 5S ДНК *T. monococtum* размером около 500 п. н., была переклонирована в плазмиде *pUC19*. Нуклеотидная последовательность гена 5S рРНК и межгенного спейсера представлена на рисунке. Для сравнения приведены также первичные структуры 5S ДНК в повторах размером 320 п. н. из этого же образца и 500 п. н., клонированной в плазмиде *pTm5S73* (*T. monococtum*, к-45297 [2]).

Нуклеотидную последовательность ДНК, кодирующей 5S рРНК, идентифицировали исходя из первичной структуры 5S рРНК мягкой пшеницы, определенной МакКеем и др. [3]. Из рисунка видно, что в направлении транскрипции клонированная нами 5S ДНК содержит кодирующий фрагмент размером 90 п. н., представляющий собой 3'-конец одного гена, межгенный спейсер и фрагмент размером 30 п. н. 5'-конца гена 5S рРНК следующего повтора. Следовательно, последовательность, узнаваемая рестриктазой *BamHI*, находится внутри кодирующей области гена 5S рРНК.

Длина повторяющейся единицы 5S ДНК, клонированной в плазмиде *pTm5S12*, равна 485 п. н. Протяженность последовательности, кодирующей 5S рРНК, как и в плаزمидах *pTm5S7* и *pTm5S73*, составляет 120 п. н. Ген 5S рРНК начинается с триплета GGA и заканчивается нуклеотидами CCC. Содержание GC-пар составляет 53,3%. Сравнение нуклеотидных последовательностей кодирующих областей 5S ДНК в



Нуклеотидные последовательности генов 5S рРНК и межгенных спейсеров у диплоидной пшеницы *T. monosocum*, клонированных в плазмиде *pTm5S12* (1), *pTm5S73* (2) и *pTm5S7* (3). Кодирующая часть заключена в рамку. Сходные нуклеотиды обозначены точками, а делеции — черточкой

Nucleotide sequences of 5S rRNA genes and intergenic spacers of diploid wheat *T. monosocum*, cloned in plasmids *pTm5S12* (1), *pTm5S73* (2) and *pTm5S7* (3). Encoding part is in a frame. Similar nucleotides in sequences are indicated by dots and deletions — by a dash

повторах одного семейства между двумя образцами *T. monosocum* (плазмиды *pTm5S12* и *pTm5S73*) показывает высокую гомологию между ними — 97,5%. Нам выявлены всего три замены — G на A, C на T и C на G в положениях 7, 47 и 97 соответственно.

Большое сходство нуклеотидных последовательностей обнаруживается также между генами 5S рРНК, локализованными в разных семействах. Различия в их структуре связаны с заменами трех нуклеотидов в указанных на рисунке позициях. Замены нуклеотидов в положениях 7 и 47 в генах 5S рРНК, клонированных в плазмиде *pTm5S7* и *pTm5S73*, идентичны. Следовательно, гены 5S рРНК у *T. monosocum*, локализованные в разных семействах повторов 5S ДНК, отличаются только заменами нуклеотидов C на T и G на C в положениях 57 и 97 соответственно.

Известно, что в геноме *T. monosocum* имеются около 12000 копий генов 5S рРНК [4]. В данном случае мы сопоставили нуклеотидные последовательности только единичных генов. Поэтому не исключено, что

среди множества копий могут быть и гены 5S рРНК с идентичной структурой независимо от их принадлежности к тому или иному семейству. Вероятно, выявляемая нами небольшая вариабельность нуклеотидных последовательностей в генах 5S рРНК является отражением внутригеномной микрогетерогенности их структуры в каждом семействе повторов. Ранее сходное явление было выявлено Герлахом и др. [5] при изучении структуры генов 5S рРНК, локализованных в повторах размерами 410 и 500 п. н. у гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*.

Протяженность межгенового спейсера 5S ДНК, клонированной в плазмиде *pTm5S12*, составляет 365 п. н. Содержание GC-пар в данной области 5S ДНК значительно ниже, чем в кодирующей части, и равно 45,2%. Различия в размерах повторяющихся единиц 5S ДНК, локализованных в семействах длиной 320 и 500 п. н., связаны с делецией 154 п. н. в центральной части межгенового спейсера. Внутривидовой изменчивости длины спейсера между генами 5S рРНК в семействе повторов размером 500 п. н. не выявляется.

В межгеновом спейсере непосредственно за геном 5S рРНК локализована последовательность, терминирующая транскрипцию. Она состоит из двух олиго-Т кластеров, образованных из пяти нуклеотидов. В центральной области терминатора имеется небольшая палиндромная последовательность ТААТТА. Сопоставляя эти области в составе плазмид *pTm5S12* и *pTm5S73*, следует отметить в целом идентичность их структуры. В то же время у последней второй кластер состоит из шести нуклеотидов. В семействе повторов 5S ДНК длиной 320 п. н. терминатор также состоит из 15 нуклеотидов и по структуре высокоомологичен данной области большого повтора. Однако имеется одна особенность. В повторах длиной 500 п. н. во втором кластере один нуклеотид Т заменен на А. Как известно, любые замены в данной области ослабляют ее терминирующую способность (см. обзор [6]). Вероятно, семейство повторов 5S ДНК длиной 320 п. н. обладает более сильным терминатором.

Характерной особенностью структуры межгенового спейсера 5S ДНК у данного вида пшеницы является наличие большого числа коротких повторяющихся последовательностей (на рисунке подчеркнуты). В межгеновом спейсере ДНК, клонированной в плазмиде *pTm5S12*, нами обнаружено около 30 сходных последовательностей. Однако структура большинства из них вариабельна. Наиболее консервативны последовательности S_{3-5} между нуклеотидами —10/—42, GTA (—117/—126), TCGT (—141/—150), A_{3-5} (—152/—164, —196/—200) и T_{3-5} (—270/—293). В целом гомология нуклеотидных последовательностей межгенового спейсера в повторах длиной 500 п. н. между двумя образцами *T. monosocum* составляет 76%, а между разными семействами в пределах одного генома — 71,3% (без учета делеции 154 п. н. в малом семействе повторов). В данной области повторов наряду с терминатором наиболее консервативна последовательность, прилегающая к 5'-концу гена 5S рРНК (до —35-го нуклеотида).

Обращает на себя внимание тот факт, что как в кодирующей области, так и в 3'-конце межгенового спейсера большинство различий в нуклеотидной последовательности связано с заменами нуклеотидов С на Т и G на А. Вероятно, это является следствием дезаминирования метилированного цитозина и превращением его в тимин. Подробно эти аспекты рассматриваются в серии работ А. Л. Мазина и Б. Ф. Вапюшина [7, 8]. Роль подобных модификаций не совсем ясна, возможно, они имеют определенное отношение к функциональному состоянию генов.

Известно, что факторы, иницирующие и регулирующие транскрипцию генов 5S рРНК, образуют комплексы с последовательностями, локализованными внутри кодирующей части между 45—97 нуклеотидами [9]. Однако роль нуклеотидных последовательностей межгенового спейсера в обеспечении функциональной активности генов 5S рРНК изучена недостаточно. Например, у *Bombyx mori* показано важное значе-

ние последовательности ТАТАТАТТТТТС, локализованной между —30/—16 нуклеотидами, для транскрипции гена 5S рРНК в гетерологичной системе [10]. У *Matthiola incana*, *Vigna radiata* [11] и *Lupinus luteus* [12] сходная последовательность также локализована ближе к 5'-концу гена 5S рРНК. В отличие от них у исследованного нами диплоидного вида пшеницы *T. monosocum*, гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* [5], *Oryza sativa* [13] и *Secale cereale* [14] эта последовательность имеет иную локализацию. Она находится между —305/315 нуклеотидами в составе плазмид *pTm5S12* и *pTm5S73* и —150/—159 нуклеотидами в 5S ДНК длиной 320 п. н. При этом данные последовательности в повторах 5S ДНК разных семейств у *T. monosocum* не идентичны. В повторах 5S ДНК с укороченным межгенным спейсером она представлена последовательностью АТАТАТТТА, а у большого повтора — АТАТАТАТТА. Возможно, в геномах растений эти нуклеотидные последовательности выполняют такую же функцию, что и у *B. mori*. Следует подчеркнуть специфическую локализацию данной последовательности у однодольных и двудольных растений. По-видимому, это обстоятельство отражает особенности механизмов транскрипции генов 5S рРНК у растений, относящихся к разным классам.

Таким образом, на основе вышесказанного можно сделать вывод, что различия в размерах двух семейств повторов 5S ДНК у диплоидной пшеницы *T. monosocum* связаны с делецией 154 п. н. в центральной области межгенного спейсера. Кодированные 5S рРНК области ДНК, терминирующие последовательности, 3'-конец межгенного спейсера, а также структура и локализация ряда простых повторяющихся последовательностей в нем высококонсервативны независимо от их принадлежности к тому или иному семейству повторов. Сходная закономерность обнаружена также в структуре повторяющихся единиц 5S ДНК длиной 500 п. н. у двух образцов *T. monosocum*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вахитов В. А., Никоноров Ю. М. Первичная структура гена 5S рРНК у диплоидной пшеницы *Triticum monosocum* L. с укороченным нетранскрибируемым спейсером // Молекуляр. биология.— 1988.—22, № 2.— С. 406—413.
2. Вахитов В. А., Гималов Ф. Р., Шуляцкий Г. П. Нуклеотидные последовательности генов 5S рРНК полиплоидных видов пшеницы и их диких сородичей // Там же.— 1989.—23, № 2.— С. 431—440.
3. Nucleotide sequences of wheat-embryo cytosol 5-s and 5.8-s ribosomal ribonucleic acids / R. M. MacKey, D. F. Spencer, W. F. Doolittle, M. W. Gray // Eur. J. Biochem.— 1980.—112, N 2.— P. 561—576.
4. Вахитов В. А., Гималов Ф. Р., Никоноров Ю. М. Определение числа копий генов, кодирующих 5S рРНК и тРНК в геномах 43 видов пшениц и эгилопов // Генетика.— 1986.—22, № 4.— С. 676—683.
5. Gerlach W. L., Dyer T. A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes // Nucl. Acids Res.— 1980.—8, N 21.— P. 4851—4865.
6. Носиков В. В., Брага Э. А. Гены рибосомных РНК // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1982.— С. 110—215. (Сер. Биол. химия; Т. 18).
7. Мазин А. Л., Ванюшин Б. Ф. Потеря динуклеотидов CpG из ДНК. 1. Метилированный и неметилированный компартменты генома у эукариот с различным содержанием 5-метилцитозина в ДНК // Молекуляр. биология.— 1987.—21, № 2.— С. 543—551.
8. Мазин А. Л., Ванюшин Б. Ф. Потеря динуклеотидов CpG из ДНК. 2. Метилированные и неметилированные гены позвоночных // Там же.— С. 552—562.
9. Functional domains of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter / T. Pieler, S.-Li Oci, J. Hamm et al. // EMBO J.— 1985.—4, N 13B.— P. 3751—3756.
10. Morton D. G., Sprague K. U. *In vitro* transcription of silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.—81, N 17.— P. 5519—5522.
11. Hemleben V., Werts D. Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S RNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*) // Gene.— 1988.—62, N 1.— P. 165—169.
12. Rafalski J. A., Wiewiorowski M., Söll D. Organization and nucleotide sequence of nuclear 5S rRNA genes in yellow lupin (*Lupinus luteus*) // Nucl. Acids Res.— 1982.—10, N 23.— P. 7635—7642.
13. Hariharan N., Reddy P. S., Radayatty J. D. 5S rRNA genes in rice embryos // Plant Mol. Biol.— 1987.—9, N 5.— P. 443—451.

14. Lawrence G. J., Appels R. Mapping the nucleolus organizer region, seed protein loci and isozyme loci on chromosome 1R in rye // Theor. and Appl. Genet.—1986.—71, N 5.— P. 742—749.

Отдел биохимии
и цитохимии Башкир. фил. АН СССР, Уфа

Получено 23.05.88

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF LARGE 5S DNA REPEAT IN DIPLOID WHEAT TRITICUM MONOCOCCUM L.

V. A. Vakhitov, Yu. M. Nikonov

Department of Biochemistry and Cytochemistry,
Bashkir Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Ufa

Summary

Nucleotide sequence of large 5S DNA repeated unit 485 base pairs long, was determined in diploid wheat *Triticum monococcum*. The differences in length in two families of 5S DNS repeats in this wheat species are shown to be related to 154 b. p. deletion in central region of intergenic spacer. A high homology of 5S rRNA coding regions, terminating sequences, 3'-ends in intergenic spacers in both families of 5S DNA repeats and also in repeats of similar length in two samples of *T. monococcum* is shown. Contrary to dicotyledon plants ATATATATTA sequence in cereal species under investigation is found to be located nearer to 5'-end of the intergenic spacer.

УДК 577.217;577.18.02

К. А. Солдаткин, О. В. Ковальчук, А. П. Иотапов, А. В. Ельская,
Н. Ф. Крынецкая, Н. Г. Долинная, З. А. Шабарова

ДЕЗОКСИРИБОАНАЛОГ АНТИКОДОНОВОЙ ВЕТВИ ДРОЖЖЕВОЙ тРНК^{Phc} НЕ СПОСОБЕН К КОДОН-ЗАВИСИМОМУ СВЯЗЫВАНИЮ С МАЛЫМИ СУБЧАСТИЦАМИ РИБОСОМ ESCHERICHIA COLI И ПЕЧЕНИ КРОЛИКА

Для изучения влияния модификаций сахарофосфатного остова антикодонной области тРНК на ее взаимодействие с рибосомами использован олигонуклеотид d(CCAGACTGAAGATCTGG), соответствующий по нуклеотидной последовательности немодифицированной антикодонной ветви дрожжевой тРНК^{Phc}. Показано, что данный олигонуклеотид в растворе образует внутримолекулярную «шпильку», однако не способен связываться с 30S и 40S субчастицами рибосом *E. coli* и печени кролика соответственно в присутствии рибо-(поли(U)) и дезоксирибо-(поли(dT)) матриц. Добавление антибиотика неомицина В не меняло ситуации.

Введение. Для объяснения механизма отбора аминоксил-тРНК на рибосомах и транслокации предложена гипотеза стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов, постулирующая прямое взаимодействие декодирующего центра рибосом с сахарофосфатным остовом кодон-антикодонных дуплексов [1—4]. Согласно гипотезе, модификации сахарофосфатного остова кодона или антикодона должны оказывать существенное влияние на взаимодействие тРНК с программированной рибосомой. Природным вариантом полинуклеотида с «модифицированным» рибозофосфатным остовом является ДНК. В норме однотяжевая ДНК не может быть транслирована в бесклеточной белоксинтезирующей системе из *E. coli*, но в присутствии некоторых аминокликозидных антибиотиков, в первую очередь неомицина В, такая трансляция становится возможной [5—7].

В этой связи большой интерес представляет изучение влияния модификаций сахарофосфатного остова антикодонной области тРНК на