



УДК 577.113.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА тРНК<sup>Asn</sup> БАКТЕРИОФАГА Т5

Шляпников М. Г., Крюков В. М., Бавв А. А.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
Академии наук СССР, Пушкино Московской обл.*

Равномерно меченная фосфором-32 фагоспецифичная тРНК<sup>Asn</sup> была выделена из клеток *E. coli*, инфицированных бактериофагом Т5. Классическим блочным методом определена ее первичная структура с использованием ТСХ на целлюлозе для фракционирования различных смесей олигонуклеотидов. Обсуждаются особенности структуры тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5 и ее гомология с аспарагиновыми тРНК из других источников.

Ранее было установлено, что бактериофаг Т5 кодирует транспортные РНК, специфичные ко всем 20 аминокислотам, участвующим в процессе трансляции [1, 2]. В ходе фаговой инфекции синтез этих РНК значительно превышает остаточный уровень синтеза тРНК *E. coli*, поэтому фагоспецифичные тРНК могут быть избирательно помечены фосфором-32 *in vivo* [1, 3]. Один из вариантов двумерного электрофореза в полиакриламидном геле, разработанный в нашей лаборатории, позволяет получить практически гомогенные препараты большей части данных тРНК [1]. Было показано также [3], что двумерная тонкослойная хроматография (ТСХ) на целлюлозе с успехом может быть применена для фракционирования различных смесей олигонуклеотидов в разработанном Сэнгером классическом блочном методе секвенирования [<sup>32</sup>P]РНК [4, 5]. Ранее с использованием указанных подходов была установлена нуклеотидная последовательность тРНК фага Т5, специфичных к глутамину, лейцину, пролину и аспарагиновой кислоте [3, 6, 7].

В настоящей статье приводятся данные по определению первичной структуры тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5, ранее обозначенной как РНК16 [1].

На рис. 1 представлено разделение в полиакриламидном геле (ПААГ) 4–5S [<sup>32</sup>P]РНК фага Т5, выделенных из инфицированных клеток *E. coli*. Методами двумерной ТСХ на целлюлозе (рис. 2) исчерпывающих гидролизатов РНК полученных таким образом фракций панкреатической и Т<sub>1</sub>-РНКазами (*p*- и *t*-олигонуклеотиды соответственно) было установлено, что три из них (отмечены на рис. 1) представляют собой одну и ту же РНК. РНК фракций I и II имеют идентичные фингерпринты и являются, очевидно, конформационными изомерами, причем в ряде экспериментов изомер фракции II не обнаруживается, а количество фракции I увеличивается. Т<sub>1</sub>-фингерпринт РНК фракции III отличается отсутствием олигонуклеотидов *t17+t18*, вместо которых в гидролизате появляется дополнительный крупный фрагмент (данные не приведены).

Структура олигонуклеотидов, образующихся при полном гидролизе РНК (фракции I и II) панкреатической и Т<sub>1</sub>-РНКазами, приведена на рис. 2 и установлена по совокупности данных по нуклеотидному составу (гидролиз РНКазой Т<sub>2</sub> и фосфодиэстеразой змеиного яда), анализа продуктов гидролиза олигонуклеотидов дополнительными РНКазами и РНКазой U<sub>2</sub> (для *t*-олигонуклеотидов), частичного гидролиза фосфодиэстеразами змеиного яда или селезенки исходных олигонуклеотидов или продуктов их расщепления РНКазой U<sub>2</sub>. Во всех случаях продукты гидролиза фракционировали двумерной ТСХ на целлюлозе. Мы не пытались разделить смеси олигонуклеотидов *t10+t12'* и *t17+t18*, так как их структура может быть однозначно выведена на основании анализа продуктов гидролиза этих смесей различными РНКазами. Следует учесть также,

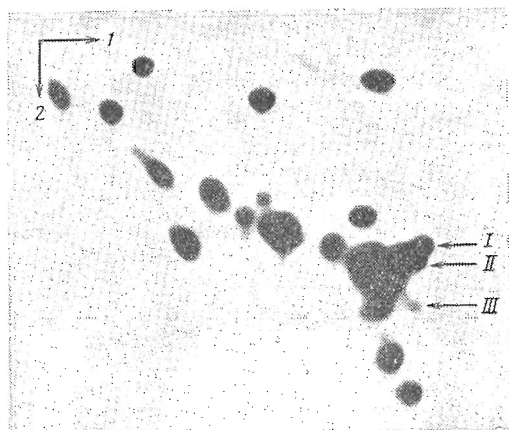


Рис. 1. Двумерный электрофорез в ПААГ 4-5S [<sup>32</sup>P]РНК фага T5. Первое направление — 10% ПААГ, 7 М мочевины, трис-борат, рН 8,3; 10 В/см, 16° С. Второе направление — 20% ПААГ, 4 М мочевины, трис-борат, рН 8,3; 15 В/см, 28° С. I—III — фракция, соответствующие tRNA<sup>Asn</sup>

что близкие по подвижности олигонуклеотиды в нашем случае не могут существенно различаться по количеству нуклеотидных остатков.

Необходимые для реконструкции молекулы крупные блоки получали ограниченным гидролизом tRNA T<sub>1</sub>-РНКазой с последующим их фракционированием в ПААГ в условиях разделения 4–5S РНК (рис. 3). Фрагментацию проводили в условиях стабилизации вторичной структуры (0° С, Mg<sup>2+</sup> [3]), при которых расщепление tRNA проходило преимущественно в антикодоновой петле с образованием 3'- и 5'-половин молекулы. Фрагменты после элюции из геля подвергали исчерпывающему гидролизу панкреатической и T<sub>1</sub>-РНКазами и продукты разделяли двумерной ТСХ. Хорошая воспроизводимость данного метода позволяет на основании хроматографической подвижности устанавливать, какие *p*- и *t*-олигонуклеотиды входят в состав того или иного крупного фрагмента при сравнении с фингерпринтами целой молекулы и ее половинок. В сомнительных случаях и в случаях появления добавочных олигонуклеотидов в панкреатических гидролизатах проводили дополнительный анализ. Из 13 проанализированных фрагментов 7 содержали минимально необходимую информацию для реконструкции всей молекулы tRNA с учетом перекрывающихся последовательностей в *p*- и *t*-олигонуклеотидах. Первичная структура tRNA<sup>Asn</sup> фага T5 в форме «клеверного листа» изображена на рис. 4. Ее антикодон представлен триплетом GUU, который предположительно может узнавать кодоны для аспарагина AAC и AAU, хотя эксперименты по определению акцепторной активности и кодоновой специфичности этой tRNA не проводились.

Минорные нуклеотиды идентифицировали по их подвижности на двумерной тонкослойной хроматограмме (рис. 5) [8]. Мы не смогли однозначно установить характер модификации основания A<sup>37</sup>, расположенного справа от антикодона. Данное основание в наших условиях представлено двумя формами, одна из которых, очевидно, соответствует промежуточной стадии сложной модификации. При щелочном гидролизе РНК (0,3 н. КОН, 37° С, 16 ч) обе формы нестабильны и примерно на 70% превращаются в нуклеотид Ар. Исходя из имеющихся сведений можно предполагать, что основание A<sup>37</sup> представляет собой N-[(9-β-D-рибофуранозил)пуридин-6-ил]карбамоил]треонин или одно из его производных, встречающихся в tRNA *E. coli* [7]. С различиями в модификации этого остатка связана различная хроматографическая подвижность соответствующих олигонуклеотидов (рис. 2), а также изменение электрофоретической подвижности 3'-половины tRNA<sup>Asn</sup> (рис. 3). Степень модификации оснований в положениях D<sup>20</sup> и m<sup>7</sup>G<sup>46</sup> составляет в нашем случае только соответственно 10 и 70%, что объясняется, вероятно, условиями, в которых про-

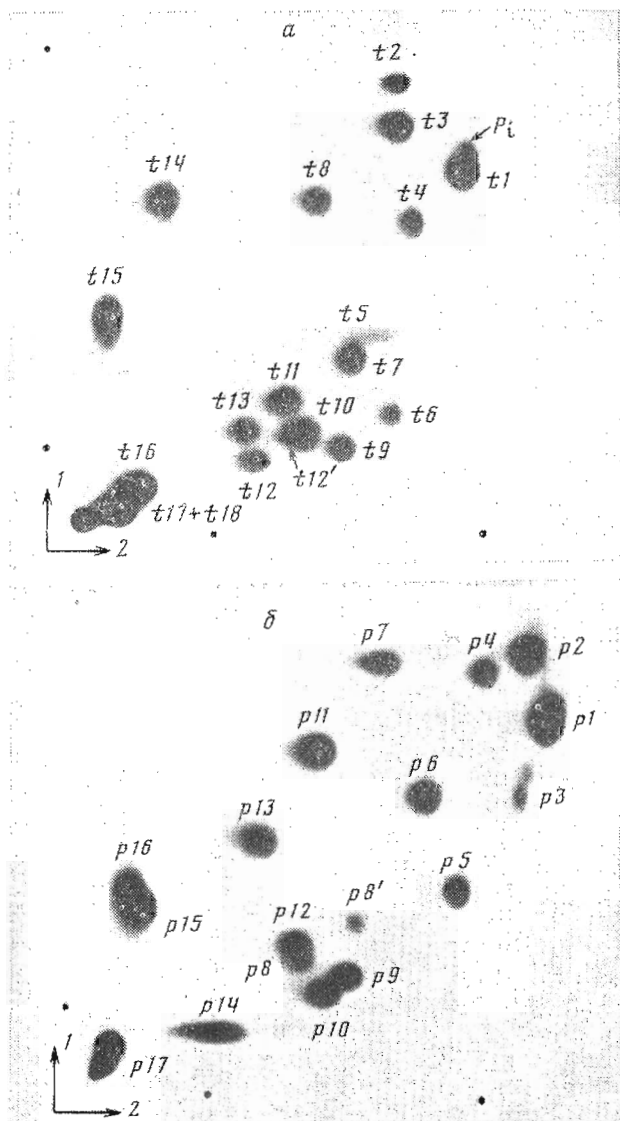


Рис. 2. Двумерная ТСХ на целлюлозе (16×16 см) и структура продуктов полного гидролиза тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5 (фракция I или II рис. 1) РНКазой Т<sub>1</sub> (а) и панкреатической РНКазой (б). 1-е направление — изомаляновая кислота — 0,5 М NH<sub>4</sub>OH, 5:3 (рН 3,7); 2-е направление — трет-бутанол — 0,075 М формиат аммония (рН 3,8), 1:1 (рН 4,8) при 15°С. Хроматография в каждом направлении проведена дважды. Р<sub>1</sub> — неорганический фосфат, А<sub>1</sub>\* и А<sub>2</sub>\* — разные формы модифицированного основания в положении 37 (см. текст). Для «а»: t1 — Gp, t2 — CCAoh, t3 — AGp, t4 — CGp, t5 — pCp, t6 — UUGp, t7 — CUGp, t8 — CACp, t9 — ψUGp, t10 — TψCGp, t11 — DUAGp, t12 — UUA<sub>1</sub>\*AGp, t12' — UUA<sub>2</sub>\*AGp, t13 — m<sup>7</sup>GUUGp, t14 — AACCGp, t15 — AAUCCAGp, t16 — CAUCUUGp, t17 — UUCCUUAGp, t18 — CUCUAAUUGp; для «б»: p1 — Up, p2 — Cp, p3 — ψp, p4 — AUp, p5 — GUp, p6 — GCp, p7 — AAUp, p8 — A<sub>1</sub>\*AGψp, p8' — A<sub>2</sub>\*AGψp, p9 — GGTp, p10 — GGDp, p11 — AGCp, p12 — GGCp, p13 — GAAUp, p14 — pGGUp, p15 — AGAGCp, p16 — AGGAACp, p17 — GAGGm<sup>7</sup>GUp

исходит синтез фаговых тРНК *in vivo* [3]. Вследствие этого в Т<sub>1</sub>-гидролизате появляется дополнительный олигонуклеотид t6, а во фрагментах t11, p10 и p17 — соответствующие немодифицированные формы. Неполная модификация некоторых нуклеотидных остатков обнаружена и в других тРНК фага Т5, выделенных аналогичным образом [3, 6].

На основании анализа дополнительного t-олигонуклеотида (результаты не показаны), присутствующего в Т<sub>1</sub>-гидролизате фракции III тРНК<sup>Asn</sup>, мы полагаем, что отличительная особенность этой фракции состоит в образовании фотохимической сшивки оснований U<sup>s</sup>—C<sup>13</sup> при облу-

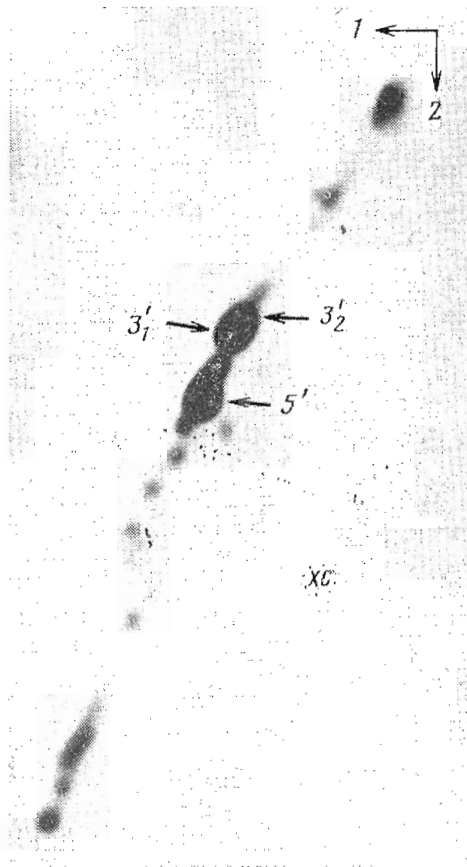


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ ограниченного  $T_1$ -гидролизата  $tRNA^{Asn}$  фага T5. Условия электрофореза аналогичны указанным в подписи к рис. 1. Отмечено положение фрагментов, соответствующих 5'- и 3'-половинам молекулы  $tRNA$ .  $3'1$  и  $3'2$  содержат разные формы модифицированного основания в позиции 37 (соответственно  $A_1'$  и  $A_2'$ , см. рис. 5). ХС — голубой маркер ксиленилалол

чещи в ячейке УФ-детектора в процессе выделения  $tRNA$ . Возможность образования такой сшивки показана для ряда  $tRNA$  [9]. Ковалентная связь обеспечивает, по-видимому, фиксацию конформации молекулы  $tRNA$  фракции III, отличной от конформации  $tRNA$  фракций I и II, в условиях их разделения в геле. Аналогичные различия в электрофоретической подвижности (конформации) наблюдаются и в случае 5'-половин  $tRNA^{Asn}$  соответствующих фракций.

Сравнение  $tRNA^{Asn}$  фага T5 с аспарагиновыми  $tRNA$  из других источников показывает относительно низкую степень подобия нуклеотидных последовательностей во всех случаях, включая  $tRNA^{Asn}$  *E. coli* (57%) [7]. Сравнительно высокой оказывается ее гомология только с аспарагиновой  $tRNA$  из *Drosophila melanogaster* (66%), что, по нашему мнению, объясняется случайным совпадением отдельных элементов структур и не отражает каких-либо филогенетических закономерностей.

Ранее было отмечено [3], что структуры всех изученных  $tRNA$  фага T5, за исключением  $tRNA^{Pro}$ , имеют ряд существенных отклонений от обобщенной модели «клеверного листа», в которую укладывается подавляющее большинство  $tRNA$ , кроме некоторых митохондриальных [7]. Одной из особенностей  $tRNA^{Asn}$  фага T5 является замена канонического остатка  $A^{14}$  на U. Такая замена интересна в том отношении, что, как полагают, остаток  $A^{14}$  наряду с другими каноническими основаниями играет важную роль в формировании третичной структуры  $tRNA$  [9]. Эта

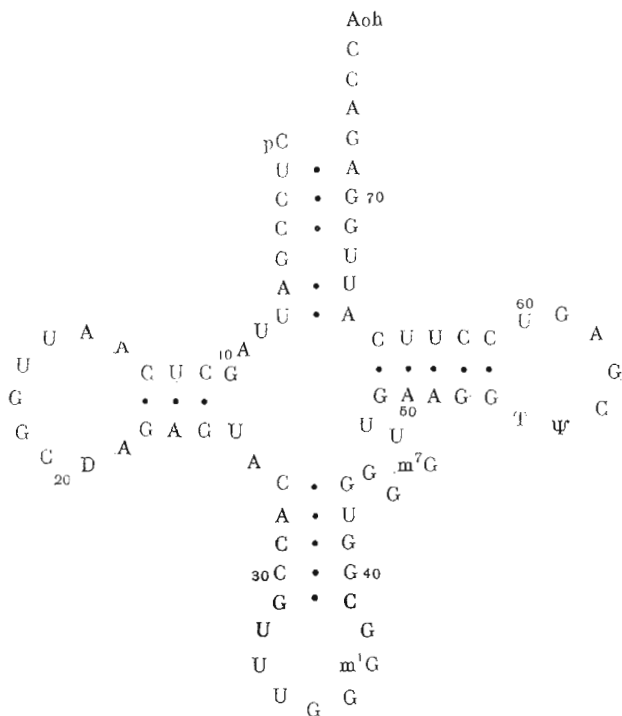


Рис. 4. Первичная структура тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5 в форме «клеверного листа». Нумерация нуклеотидных остатков соответствует нумерации в дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> [7]

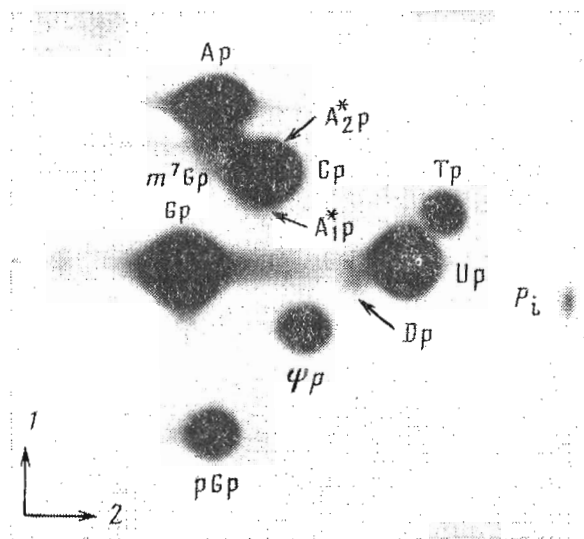


Рис. 5. Определение нуклеотидного состава тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5. Т<sub>2</sub>-гидролизат тРНК<sup>Asn</sup> фракционировали двумерной ТСХ на целлюлозе. 1-е направление — изомасляная кислота — 0,5 н. NH<sub>4</sub>OH, 5:3 (рН 3,7); 2-е направление — изопропанол — конц. HCl — вода, 68:17:15. P<sub>i</sub>, A<sub>1</sub>\*p и A<sub>2</sub>\*p — см. подпись к рис. 2

замена приводит также к возможности образования трех дополнительных комплементарных пар в дигидроуридиловой шпильке за счет оснований соответствующей петли. Аналогичная особенность обнаружена ранее в двух супрессорных тРНК<sup>Ser</sup> из печени быка [10], хотя такие дополнительные пары могут не образовываться в реальной третичной структуре тРНК.

Другая аномалия в структуре тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5 заключается в отсутствии комплементарности между остатками G<sup>27</sup>-A<sup>43</sup> и U<sup>30</sup>-ψ<sup>40</sup> в антикодонной шпильке, что должно существенно снижать стабильность двойной спирали данного участка молекулы. Тем не менее, судя по ее относительному количеству в суммарном препарате 4-5S РНК, устойчивость тРНК<sup>Asn</sup> к действию РНКаз клетки не отличается заметно от устойчивости других тРНК фага.

Установлено [2, 6], что по крайней мере аминокислотирование фаговых тРНК *in vitro* и, по-видимому, *in vivo* осуществляется соответствующими ферментами *E. coli*. В связи с этим, принимая во внимание отсутствие подобных аномалий в изоакцепторной тРНК *E. coli*, остается неясным, как отмеченные особенности структуры тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5 влияют на ее функциональную активность.

### Экспериментальная часть

Использованные в работе материалы, а также методы выделения [<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Asn</sup> фага Т5 и определения ее первичной структуры аналогичны приведенным в работе [3].

Условия фракционирования 4-5S РНК и продуктов гидролиза тРНК<sup>Asn</sup> различными РНКазами даны в подписях к соответствующим рисункам.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Казанцев С. И., Чернов А. И., Шляпников М. Г., Крюков В. М., Баяев А. А. Докл. АН СССР, 1979, т. 247, № 3, с. 744-748.
2. Hunt C., Desai S. M., Vaughan J., Weiss S. B. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 7, p. 3164-3173.
3. Shlyapnikov M. G., Kaliman A. V., Kazantsev S. I., Kryukov V. M., Bayev A. A. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 782, № 3, p. 313-319.
4. Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. G. J. Mol. Biol., 1965, v. 13, № 2, p. 373-398.
5. Barrell B. G. In: Procedures in Nucleic Acid Research/Eds Cantoni G. L., Davies D. R. N. Y.-L., 1971, v. 2, p. 751-779.
6. Shlyapnikov M. G., Kazantsev S. I., Kryukov V. M., Bayev A. A. FEBS Lett., 1985, v. 192, № 2, p. 299-302.
7. Sprinzl M., Gauss D. H. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, p. r1 - r131.
8. Nishimura A. In: Progress in Nucl. Acid. Res. and Mol. Biol./Eds Davidson J. N., Cohn W. E. N. Y.: Acad. Press, 1972, v. 12, p. 48-85.
9. Goddard J. P. In: Progress in Biophys. and Mol. Biol./Eds Butler J. A. V., Noble D. N. Y.: Pergamon Press, 1977, v. 32, p. 233-308.
10. Hatfield D., Diamond A., Dudock B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 20, p. 6215-6219.

Поступила в редакцию  
14.VIII.1986

### THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE BACTERIOPHAGE T5 tRNA<sup>Asn</sup>

SHLYAPNIKOV M. G., KRYUKOV V. M., BAYEV A. A.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,  
Academy of Sciences of the USSR, Puschino, Moscow Region*

Uniformly <sup>32</sup>P-labelled phage-specific tRNA<sup>Asn</sup> was isolated from bacteriophage T5-infected *E. coli* cells its oligonucleotide fragments were fractionated by thin-layer chromatography on cellulose and the tRNA's primary structure was determined as follows: pGGUUCUUAGCUCUAAUGGDUAGAGCGGCAUCUUCUUA\*AGψUGAGGm<sup>7</sup>GU·UGCUGGTψCGAAUCCAGCAGGAACCGCCAoh. Main features of the structure are: i) displacement of the constant residue A<sup>14</sup> by U; ii) absence of G<sup>27</sup>·A<sup>43</sup> and U<sup>30</sup>·ψ<sup>40</sup> pairing in the anticodon stem; iii) possibility of additional pairing in D-loop. Comparison of T5 tRNA<sup>Asn</sup> with other asparagine tRNAs is presented.