



УДК 577.217.335

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ОСТАТКОВ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ тРНК^{Ser} И тРНК^{Leu} ИЗ *Thermus thermophilus*

© 1999 г. О. П. Коваленко, З. М. Петрушенко,
И. А. Крикливый, А. Д. Яремчук, М. А. Тукало[#]

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, ул. Заболотного, 150

Поступила в редакцию 18.01.99 г. Принята к печати 22.04.99 г.

Реакционную способность фосфатов тРНК^{Ser} (GCU) и тРНК^{Leu} (CAG) из *Thermus thermophilus* исследовали методом химической модификации с помощью этилнитрозомочевины. Показано, что в обеих тРНК низкий уровень модификации имеют фосфаты нуклеотидов 58–60 (Т-петля), 20–22 (D-петля) и 48 на стыке варибельного и Т-стеблей. Наиболее существенные различия в реакционной способности наблюдаются для фосфатов нуклеотидов двух тРНК, расположенных на стыках антикодонного и варибельного (45), а также варибельного и Т-стеблей (47q, 49), что свидетельствует о различной ориентации длинной варибельной ветви относительно “тела” молекулы в исследованных тРНК.

Ключевые слова: тРНК II класса; рибозофосфатный остов; метод химической модификации.

ВВЕДЕНИЕ

Лейциновые и сериновые транспортные РНК, имеющие длинную варибельную ветвь, вызывают особый интерес у исследователей. Недавно с помощью генетических методов было показано, что тРНК^{Leu} и тРНК^{Ser} узнаются гомологичными аминоксил-тРНК-синтетазами особым, антикодон-независимым способом [1, 2], тогда как для тРНК с короткой варибельной петлей (кроме тРНК^{Ala} [3]) антикодон является одним из основных элементов узнавания [4–7]. Главную роль в процессе специфичного узнавания тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} играют элементы третичной структуры их молекул. Использование генетических методов не позволяет установить конкретные особенности пространственной организации молекул тРНК. В то же время, результаты рентгеноструктурного анализа кристаллов комплекса тРНК^{Ser}(GGA)–Ser–тРНК-синтетаза из *Thermus thermophilus* свидетельствуют об определяющем значении конформации рибозофосфатного остова тРНК^{Ser} для узнавания ферментом [8]. Решение вопроса дискриминации тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} *T. thermophilus* гомологичными аминоксил-тРНК-синтетазами требует детального знания конформаций соответствующих тРНК в физиологических условиях, то есть в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе приведены результаты сравнительного изучения реакционной способности фосфатов тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} из *T. thermophilus*, полученные с помощью модификации тРНК этилнитрозомочевинной по методу, предложенному Власовым [9]. Этилнитрозомочевина алкилирует ОН-группы межнуклеотидных фосфатов, причем уровень модификации пространственно затрудненных фосфатов в нативных тРНК заметно снижен [9]. Алкилирование тРНК проводили как в условиях, стабилизирующих пространственную структуру макромолекулы, так и в денатурирующих условиях. Продукты расщепления нуклеиновой кислоты анализировали методом быстрого секвенирования в ПААГ; автордиограммы с результатами типичных экспериментов приведены на рис. 1. Относительную реакционную способность фосфатов тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} рассчитывали из денситограмм соответствующих электрофоретических треков (денситограммы не приведены). В связи с неколичественным осаждением коротких фрагментов после щелочного гидролиза модифицированной тРНК снижается объективность информации об активности концевых фосфатов (P1–P5, P70–P76 тРНК^{Ser} и P1–P8, P70–P76 тРНК^{Leu}). В исследуемых тРНК в положении 18 находится нуклеотидный остаток с 2'-O-метилрибозой (тРНК^{Ser} – [10], тРНК^{Leu} – Коваленко О.П., неопубликованные результаты), что в значительной степени затрудняет расщепление фосфодиэфир-

[#] Автор для переписки (тел.: (044) 266-55-89; факс: (044) 266-07-59; e-mail: mtukalo@imb.g.kiev.ua).

ной связи между нуклеотидами 18 и 19 и не дает возможности определить уровень модификации 5'-фосфата нуклеотида G19. В тРНК^{Leu} не удалось также изучить реакционную способность фосфатов нуклеотидов 20а, 28 и 47d в связи с неспецифической деградацией полинуклеотидной цепи в этих точках. Явление спонтанного гидролиза тРНК в процессе аналогичных экспериментов хорошо известно [11–13] и особенно характерно для последовательностей пириимидин–аденозин в составе РНК [14], что и происходит в случае тРНК^{Leu} *T. thermophilus*.

Из кривых расчета денситограмм (рис. 2) видно, что фосфаты, имеющие низкий ($R \leq 0.5$) или существенно сниженный ($0.5 < R \leq 0.6$) уровень модификации в неденатурирующих условиях, сосредоточены в четырех районах тРНК^{Ser} *T. thermophilus*: D-петле (P20–P22), вариательной петле (P47h–P47j), T-петле (P54, P58–P60) и на соединении вариательного участка и T-стебля (P47q–P49).

В тРНК^{Leu} *T. thermophilus* картина распределения фосфатов с пониженной реакционной способностью несколько иная: кроме фосфатов D-петли (P18, P20–P22) и T-петли (P58–P60) низкий уровень модификации реагентом имеют фосфаты D-стебля (P11, P12), а также фосфаты, расположенные у основания вариательного стебля (P45, P48).

Расположение фосфатов, имеющих низкую реакционную способность в неденатурирующих условиях, в структурах тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} *T. thermophilus* показано на рис. 3.

Низкий уровень модификации фосфатов нуклеотидов 58 и 60, а также наличие в структурах исследуемых тРНК консервативных нуклеотидных остатков в положениях 54, 58 и 61 свидетельствуют о том, что пространственная укладка T-петель происходит по схеме, впервые описанной для тРНК^{Phe} дрожжей, относящейся к тРНК I класса [15, 16]. Атомы кислорода фосфата 60 образуют водородные связи с нуклеотидными остатками в положениях 61 (O1(P60)···N4(C61)) и 58 (O2(P60)···O2'(m'A58)). Фосфат нуклеотида 58 взаимодействует с атомом N3 остатка Ψ55. Низкий уровень модификации фосфата 59, вероятно, является следствием стерических затруднений для действия реагента, возникающих при взаимодействии D- и T-петель и образовании L-формы тРНК.

При создании компьютерной модели пространственной структуры тРНК^{Ser} дрожжей было отмечено, что остов вариательной петли, состоящей из трех нуклеотидов, образует карман, удобный для связывания Mg²⁺ [17]. Образование такого Mg²⁺-связывающего кармана вполне возможно и в случае тРНК^{Ser} из *T. thermophilus*. Пониженная

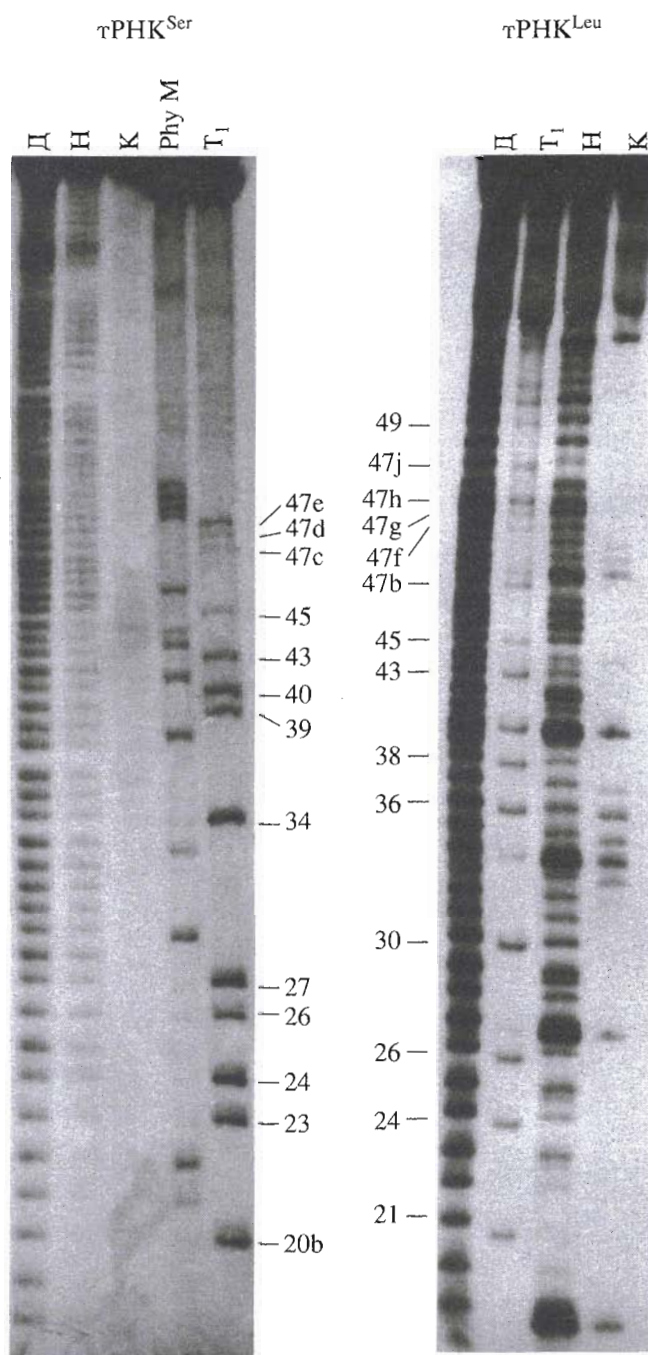


Рис. 1. Разделение в 12.5% ПААГ продуктов гидролиза 5'-меченых тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu}, алкилированных этилнитрозомочевниной в денатурирующих условиях (Д) и в условиях, стабилизирующих пространственную структуру (Н); К – гидролизат контрольной инкубации тРНК в отсутствие реагента; T₁ и Phy M – тРНК, частично гидролизованная рибонуклеазами T₁ и Phy M, соответственно.

реакционная способность межнуклеотидных фосфатов вариательной петли тРНК^{Ser} *T. thermophilus* объясняется их возможным взаимодействием с ионами металла.

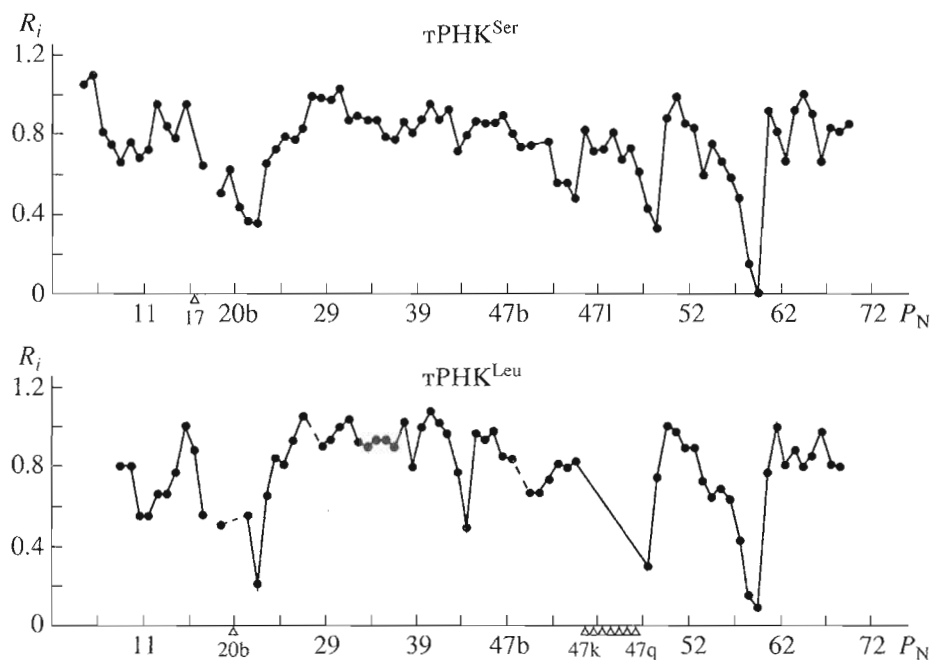


Рис. 2. Относительные реакционные способности фосфатов тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu}. P_N – номера фосфатов. Пунктирными линиями обозначены участки неспецифической деградации полинуклеотидной цепи.

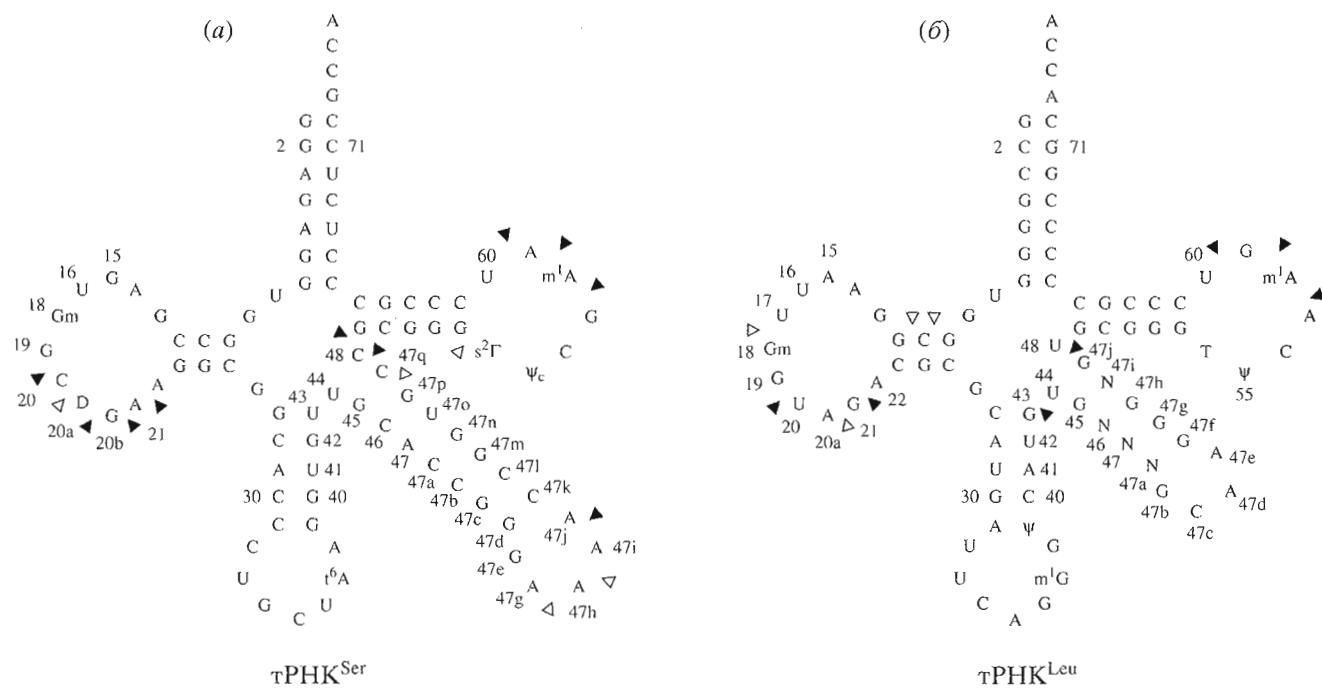


Рис. 3. Структуры тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} в виде клеверного листа. Обозначены фосфаты с низким (▲) или существенно пониженным (△) уровнем модификации в условиях, стабилизирующих нативную структуру макромолекулы. N – нуклеотиды, природа которых не определена.

В тРНК^{Leu} *T. thermophilus* снижение реакционной способности фосфатов вариательной петли не наблюдается. По-видимому, это может быть связано с меньшей ее длиной (в тРНК^{Ser} – 5 нуклеотидов, в тРНК^{Leu} – 4).

Однако наибольший интерес вызывают результаты изучения реакционной способности фосфатов, расположенных в D-петле и в основании вариательной ветви. По данным рентгеноструктурного анализа [8], в коре тРНК^{Ser} *T. thermophilus*

найжены два необычных тройных взаимодействия: G15–C48–D20a и G9–G13–A22. Последнее взаимодействие дополнительно стабилизировано водородными связями, образованными фосфатной группой нуклеотида A22 с основанием нуклеотида G9 [8]. Низкая реакционная способность фосфата 22 как в тРНК^{Ser}, так и в тРНК^{Leu} *T. thermophilus* свидетельствует о том, что подобное внутримолекулярное взаимодействие осуществляется и в обеих тРНК в растворе. Для эукариотических тРНК^{Leu} (из фасоли [12] и из молочной железы коров [18]) и тРНК^{Ser} (дрожжи, [16]) и прокариотических тРНК^{Tyr} (*E. coli*, *T. thermophilus* [Егорова С.П., (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины) неопубл. результаты]), изученных ранее, также характерен низкий уровень модификации фосфата 22 в неденатурирующих условиях. Это дает основание предполагать, что коровые взаимодействия с участием фосфата нуклеотида 22 являются характерной чертой тРНК II класса. Исключение – тРНК^{Sec} *E. coli*, что может быть связано с особенностями ее структуры, в частности, с уникальным строением D-ветви [19].

В кристалле комплекса тРНК^{Ser} *T. thermophilus* с гомологичной Ser-тРНК-синтетазой β -участок D-петли сближен с вариательной ветвью, и их взаимодействие определяет ориентацию последнего относительно “тела” молекулы. При этом сахарофосфатный остов D-петли приобретает необычную зигзагообразную конфигурацию [8]. В растворе и в тРНК^{Ser}, и в тРНК^{Leu} *T. thermophilus* происходит снижение реакционной способности фосфатов нуклеотидов 18–22 D-петли, однако снижение уровня модификации фосфатов, расположенных в основании их вариательной ветви неодинаково. В тРНК^{Ser} низкий уровень модификации наблюдали для фосфатов нуклеотидов, расположенных на стыке вариательного и T-стеблей (P47q–P49). В тРНК^{Leu} низкую реакционную способность имеет только фосфат 48. Кроме того, происходит снижение реакционной способности фосфата нуклеотида 45, расположенного на стыке антикодонового и вариательного стеблей.

Таким образом, можно предположить, что взаимодействие D-петли с вариательной ветвью в сериновых и лейциновых тРНК происходит по-разному. Наиболее вероятное следствие этих различий – разная ориентация вариательной ветви относительно “тела” тРНК.

Недавно с помощью генетических методов было показано, что для сериновых тРНК как про-, так и эукариотического типа направление вариательной ветви играет определяющую роль в процессе специфичного узнавания тРНК^{Ser} Ser-тРНК-синтетазой [1, 2, 20–22]. По данным рентгеноструктурного анализа, при образовании комплекса Ser-тРНК-синтетаза из *T. thermophilus* взаимодей-

ствует непосредственно с вариательным стеблем тРНК^{Ser}, образуя широкую контактную зону, что подтверждено также биохимическими исследованиями комплекса в растворе [23]. При этом подавляющее большинство водородных связей образовано ферментом с сахарофосфатным остовом тРНК-субстрата, т.е. не зависит от первичной структуры последнего.

Таким образом, мы можем предположить, что наблюдаемые различия во взаимодействии D-петли и вариательного стебля, а, следовательно, и направление последнего, в тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} *T. thermophilus* важны для дискриминации этих тРНК Ser-тРНК-синтетазой. По данным рентгеноструктурного анализа комплекса тРНК^{Ser} с этим ферментом, ориентация вариательного стебля тРНК^{Ser} определяется стэкингом нуклеотида G20b с первой парой нуклеотидов вариательного стебля [8]. Данное положение фиксируется также дополнительной водородной связью, образованной между рибозой нуклеотида G20b и NH₂-группой остатка цитидина, в положении 48. В лейциновых тРНК прокариот нуклеотид в положении 20b отсутствует, а в положении 48 находится абсолютно консервативный для тРНК этого семейства остаток уридина [24]. В тРНК^{Leu} наблюдается меньшее по сравнению с тРНК^{Ser} экранирование фосфатных групп нуклеотидов, расположенных на стыке вариательного и T-стеблей, но создаются условия для экранирования фосфата 45, находящегося в углу между вариательным и антикодоновым стеблями. Возможно, такие особенности во взаимодействии длинного вариательного стебля с кором молекулы при образовании L-формы тРНК^{Leu}, играют определенную роль в предотвращении ошибочного аминокислотирования тРНК^{Leu} негомологичными аминокислот-тРНК-синтетазами. При этом ориентация вариательной ветви сама по себе может не быть критичной для специфичного взаимодействия с Leu-тРНК-синтетазой.

С помощью модификации этилнитрозомочевой было установлено, что фосфатные группы в составе вариательной ветви тРНК^{Leu} из молочной железы коров и фасоли не участвуют в контактах с гомологичными аминокислот-тРНК-синтетазами [13, 25], что также справедливо для комплекса лейциновой тРНК *E. coli* с Leu-тРНК-синтетазой фасоли [13]. Участки взаимодействия тРНК^{Leu} с ферментом локализованы в антикодоновом и D-стеблях. По предварительным данным, зоны контакта тРНК^{Leu} *T. thermophilus* с гомологичной Leu-тРНК-синтетазой также не затрагивают вариательной ветви [Коваленко О.П., неопубликованные результаты]. Эти результаты хорошо согласуются с данными генетических исследований, которые показали, что замена длинной вариательной ветви тРНК^{Leu} *E. coli* на консенсусную

последовательность варибельной петли тРНК I класса вызывает лишь небольшое снижение эффективности аминоацилирования мутантной тРНК лейцином *in vivo* без нарушения специфичности [26]. Однако эксперименты *in vitro* показали, что длинная варибельная ветвь имеет определенное вспомогательное значение для процессов дискриминации тРНК^{Leu} с другими тРНК II класса [1]. Основную роль при этом играют нуклеотиды D-ветви. В случае тРНК^{Leu} и тРНК^{Ser} *T. thermophilus* мы не наблюдали каких-либо существенных различий в реакционной способности соответствующих фосфатных групп нуклеотидов D-ветвей. По-видимому, для дискриминации этих тРНК Leu-тРНК-синтетазой важна природа или взаимное расположение в третичной структуре оснований нуклеотидов D-петли.

В настоящее время ведутся исследования третичной структуры тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} из *T. thermophilus* с помощью модификаторов, специфичных к основаниям, что, возможно, позволит более детально охарактеризовать особенности пространственной организации этих макромолекул.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты индивидуальных тРНК^{Ser} (GCU) и тРНК^{Leu} (CAG) выделяли из суммарной тРНК *Thermus thermophilus* методами, описанными нами ранее [10].

В работе использовали [α -³²P]АТФ и [γ -³²P]АТФ с уд. акт. 2000–3000 Ки/ммоль (Amersham, Англия), щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1), фосфодиэстеразу змеиного яда (КФ 3.1.4.1) (Sigma, США), Т₁-РНКазу (КФ 3.1.27.3; Sankyo, Япония); полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), выделенную из *E. coli*, инфицированной фагом Т4 (Boehringer, ФРГ); тРНК-нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.2.1), выделенную, как описано в работе [27].

Мечение тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} по 3'- и 5'-концу проводили в соответствии с работами [28] и [9].

Частичный гидролиз Т1-РНКазой осуществляли как в работе [29].

Алкилирование тРНК этилнитрозомочевинной (Sigma, США) проводили в двух экспериментальных условиях: стабилизирующих пространственную структуру макромолекулы (0.3 М какодилат натрия рН 8.0, содержащий 0.02 М MgCl₂, 0.1 М NaCl, 2 мМ EDTA, при 65°C в течение 5 мин) и в денатурирующих (0.3 М какодилат натрия рН 8.0, 2 мМ EDTA, 80°C, 2 мин). Этилнитрозомочевину добавляли в реакционную смесь в виде насыщенного раствора в этаноле: 5 мкл раствора реагента к 20 мкл буферного раствора, содержащего 0.4 мкг индивидуальной тРНК^{Ser} или тРНК^{Leu}, меченной по одному из концов, а также 10 мкг суммарной

тРНК из *T. thermophilus*. В контрольных экспериментах вместо насыщенного раствора реагента был добавлен чистый этанол.

После алкилирования реакционную смесь подкисляли 1.5 М ацетатом натрия (рН 5.0) и тРНК осаждали спиртом. Для лучшего осаждения в смесь добавляли 10 мкг суммарной тРНК из *T. thermophilus*. Расщепление полинуклеотидной цепи по модифицированным остаткам проводили как описано в работе [29]. Полученные образцы гидролизованной тРНК анализировали гель-электрофорезом в 12.5% ПААГ в 0.05 М Трис-боратном буфере, рН 8.3, содержащем 1×10^{-3} М EDTA и 8 М мочевины. Отнесение электрофоретических полос проводили сравнением их подвижности с подвижностью фрагментов тРНК^{Ser} или тРНК^{Leu}, полученных путем частичного гидролиза рибонуклеазой Т₁. Радиоавтографы гелей сканировали с помощью денситометра UltraScan XL фирмы LKB (Швеция). Относительный уровень модификации фосфатов представлен как величина R_i; отношение интенсивностей соответствующих полос, полученных после разделения фрагментов тРНК, алкилированной в нативных и денатурирующих условиях. Диапазон изменения величины R_i от 0 (фосфат не модифицирован) до 1 (фосфат модифицирован полностью). Погрешность, допущенная при расчетах R_i, не превышает 15%.

М.А. Тукало благодарит Медицинский институт им. Х. Хьюса (США) за частичную поддержку исследования (грант № 75195-48201).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Asahara H., Himeno H., Tamura K., Hasegawa T., Watanabe K., Shimizu M. // J. Mol. Biol. 1993. V. 231. P. 219–229.
2. Asahara H., Himeno H., Tamura K., Nameki N., Hasegawa T., Shimizu M. // J. Mol. Biol. 1994. V. 236. P. 738–748.
3. Tamura K., Asahara H., Himeno H., Hasegawa T., Shimizu M. // J. Mol. Recogn. 1991. V. 4. P. 129–132.
4. McClain W.H. // J. Mol. Biol. 1993. V. 234. P. 257–280.
5. Normanly J., Abelson J. // Annu. Rev. Biochem. 1989. V. 58. P. 1029–1049.
6. Schimmel P. // Annu. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 125–158.
7. Yarus M. // Cell. 1988. V. 55. P. 739–741.
8. Biou V., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. // Science. 1994. V. 263. P. 1404–1410.
9. Vlassov V. V., Giegé R., Ebel J.P. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 119. P. 51–59.
10. Петрушенко З.М., Коваленко О.П., Мальченко Н.Н., Крикливый И.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // Биополимеры и клетка. 1997. Т. 13. С. 202–208.

11. Mougél M., Eyermann F., Westhof E., Romby P., Expert-Bezancón A., Ebel J.P., Ehresmann C., Ehresmann B. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 198. P. 91–107.
12. Florentz C., Briand J.P., Romby P., Hirth L., Ebel J.P., Giegé R. // *EMBO J.* 1982. V. 1. P. 269–276.
13. Dietrich A., Romby P., Maréchal-Drouard L., Gguillemaut P., Giegé R. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 2589–2597.
14. Romby P., Moras D., Dumas P., Ebel J.P., Giegé R. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 195. P. 193–204.
15. Quigley G.J., Rich A. // *Science.* 1976. V. 194. P. 796–800.
16. Romby P., Carbon P., Westhof E., Ehresmann C., Ebel J.P., Ehresmann B., Giegé R. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1987. V. 5. P. 669–687.
17. Dock-Bregeon A.C., Westhof E., Giegé R., Moras D. // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 206. P. 707–722.
18. Петрушенко З.М., Тукало М.А., Мацука Г.Х. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. С. 1492–1497.
19. Baron C., Westhof E., Böck A., Giegé R. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 231. P. 274–292.
20. Himeno H., Hasegawa T., Ueda T. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6815–6818.
21. Breitschopf K., Achsel T., Bush K., Gross H.J. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 3633–3637.
22. Wu X.-Q., Gross H.J. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5589–5594.
23. Коваленко О.П., Петрушенко З.М., Мальченко Н.Н., Крикливий И.А., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // *Биополимеры и клетка.* 1997. Т. 13. С. 298–302.
24. Sprinzl M. M., Dank N., Nock S., Schon A. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19, Suppl. P. 2127–2171.
25. Петрушенко З.М., Тукало М.А., Гудзера О.И., Рожко О.Т., Мацука Г.Х. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 1647–1652.
26. Normanly J., Ollick T., Abelson J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 5680–5684.
27. Rether B., Bonnet J., Ebel J.-P. // *Eur. J. Biochem.* 1974. V. 50. P. 281–288.
28. Silberklang M., Gillum A.M., RajBhandary U.L. // *Nucl. Acids Res.* 1977. V. 4. P. 4091–4108.
29. Donis-Keller H., Maxam A.M., Gilbert W. // *Nucl. Acids Res.* 1977. V. 4. P. 2527–2538.
30. Vlassov V.V., Giegé R., Ebel J.-P. // *FEBS Lett.* 1980. V. 120. P. 12–16.

A Comparative Study of Phosphate Reactivities in tRNA^{Ser} and tRNA^{Leu} from *Thermus thermophilus*

O. P. Kovalenko, Z. M. Petrushenko, I. A. Krikliivyi, A. D. Yaremchuk, and M. A. Tukalo[#]

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
ul. Zabolotnogo 150, Kiev, Ukraine*

The reactivity of phosphates in the *Thermus thermophilus* tRNA^{Ser} (GCU) and tRNA^{Leu} (CAG) was studied using the ethylnitrosourea modification. It was shown that phosphates of nucleotides 58–60 (T loop), 20–22 (D loop), and 48 (at the junction of the variable and T stems) were poorly modified in both tRNAs. The most pronounced differences in the reactivity were observed for phosphates at the junctions of the variable stem with T-stem (47q, 49) and anticodon stem (45). This indicates differences in orientations of the long variable arm relative to the backbone in the tRNAs studied.

Key words: chemical probes, class II tRNA, ribosophosphate backbone

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: (044) 266-5589; fax: (044) 266-0759; e-mail: tukalo@imbg.kiev.ua.