



УДК 577.217.337.2.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЙОНА s^4U^8 тРНК^{Phe}
С тРНК—(АДЕНИН-1)-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗой
ИЗ *THERMUS THERMOPHILUS*

Венкстери Т. В.*, Грайфер Д. М., Грачева Э. А.,
Карпова Г. Г., Морозов И. А.*, Шишкин Г. В.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР;

* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Изучена фотоаффинная модификация тРНК—(аденин-1)-метилтрансферазы (ЖФ 2.1.1.36) производимым тРНК^{Phe} (*E. coli*), несущим 4-азидофенилмеркурогруппу на остатке 4-тиоуридина, а также прямая фотосшивка тРНК^{Phe} с этим ферментом через остаток 4-тиоуридина. Показано, что в обоих случаях происходит ковалентное присоединение тРНК^{Phe} или ее производного к ферменту в составе специфического комплекса. Полученные данные демонстрируют хорошее соответствие между результатами фотоаффинной модификации и прямых шивок и однозначно свидетельствуют о наличии контакта между остатком 4-тиоуридина и тРНК—(аденин-1)-метилтрансферазой в составе соответствующего комплекса.

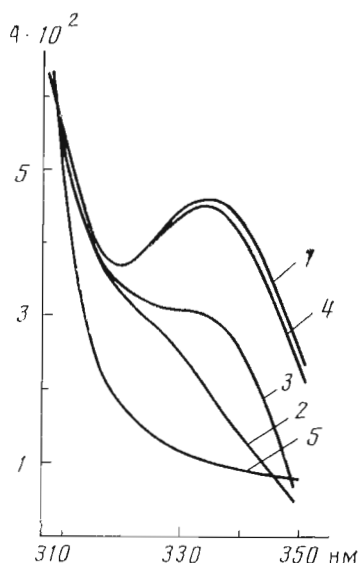
Одной из актуальных проблем молекулярной биологии является выяснение механизмов белково-нуклеиновых взаимодействий при образовании специфических нуклеопротеидных комплексов. Многие работы посвящены изучению организации комплексов тРНК с аминоксил-тРНК—синтетазами [1] и рибосомами в различных функциональных состояниях [2]. Хуже изучены комплексы тРНК с тРНК-модифицирующими ферментами, в частности с тРНК-метилтрансферазами (тРНК-метилазами). Эти ферменты осуществляют перенос метильной группы с S-аденозил-L-метионина на определенный нуклеотид, находящийся в определенном месте молекулы тРНК. Ранее было показано, что тРНК-метилазы узнают в тРНК не последовательность оснований, а некоторые характерные особенности третичной структуры тРНК [3].

Для изучения мест контакта в комплексах тРНК с метилазой нами был получен гомогенный препарат тРНК—(аденин-1)-метилтрансферазы (m¹A-метилазы) из экстремальных термофильных бактерий *Thermus thermophilus* [4]. Этот фермент катализирует образование метилированного по первому положению аденина, расположенного в 58-й позиции (ТΨ-петля) молекулы тРНК, имеет оптимум активности 75–80°С и состоит из нескольких одинаковых субъединиц с M_r 25 000 [4, 5]. В недавней работе*, применяя метод футпринта (сравнения частичных РНКазных гидролизатов свободной тРНК и тРНК в комплексе с метилазой), а также спектральные методы, мы показали, что ряд нуклеотидов тРНК^{Val} из дрожжей, расположенных в основании акцепторного стебля и примыкающих к нему участках D- и ТΨ-стеблей, участвуют во взаимодействии с m¹A-метилазой. На модели третичной структуры тРНК эти нуклеотиды образуют компактную область, которую можно считать местом наиболее тесного контакта субстрата с ферментом. Вероятно, что m¹A-метилаза и в случае других тРНК контактирует с теми же участками молекулы.

Поскольку ни один из используемых сейчас методов не может дать достаточно полную и однозначную информацию о строении блок-нуклеинового комплекса, важное значение приобретает сравнение данных, полученных различными методами. Одним из подходов к изучению контактов

* Работа будет опубликована в журнале «Молекулярная биология» в начале 1988 г.

Рис. 1. УФ-спектры тРНК^{Phe} *E. coli* в водном растворе ($A_{260}=4,2$): 1 — исходная тРНК^{Phe}; 2 — азидо-тРНК; 3 — азидо-тРНК, обработанная 10 мМ β-меркаптоэтанолом при 20° С в течение 5 мин; 4 — азидо-тРНК, обработанная 2,5 М β-меркаптоэтанолом при 37° С в течение 10 мин; 5 — тРНК^{Phe}, окисленная 0,6% H₂O₂ (20° С, 15 мин)



тРНК с рибосомами и ферментами являются прямые тРНК-белковые и тРНК-рРНК шивки, а также аффинная модификация производными тРНК, несущими реакционноспособные группы, обычно активируемые облучением УФ-светом с длиной волны 310 нм [6].

В данной работе изучалась фотоаффинная модификация т⁴А-метилазы производным тРНК^{Phe} *E. coli*, несущим относительно короткую (9 Å) фотоактивируемую 4-азидофенилмеркурогруппу на остатке 4-тиоуридина в 8-м положении (s^4U^8). Поскольку сам s^4U может активироваться мягким УФ-светом ($\lambda_{max}=335$ нм) [7, 8], в контрольных экспериментах были изучены прямые фотосшивки немодифицированной тРНК^{Phe} с т⁴А-метилазой при облучении УФ-светом с $\lambda > 310$ нм.

Для введения реакционноспособной группы тРНК^{Phe} обрабатывали 4-(ацетоксимеркуро)фенилазидом — реагентом, предложенным для модификации сульфгидрильных групп [9]. В полученном производном (в дальнейшем азидо-тРНК) исчезает характерный для s^4U максимум поглощения при 335 нм (рис. 1), что свидетельствует о присоединении 4-азидофенилмеркурогруппы к остатку тиоуридина. При обработке азидо-тРНК β-меркаптоэтанолом в жестких условиях максимум поглощения при 335 нм появляется вновь — очевидно, за счет удаления модифицирующего остатка с s^4U , что также подтверждает факт присоединения 4-азидофенилмеркурогруппы к этому остатку.

Функциональную активность азидо-тРНК по отношению к т⁴А-метилазе определяли в условиях исчерпывающего метилирования тРНК с использованием S-аденозил-[¹⁴C]метионина, как описано в работе [4]. Включение [¹⁴C]CH₃-групп в модифицированную и немодифицированную тРНК^{Phe} или в тРНК_I^{Val} было практически одинаковым и для тРНК^{Phe} составляло примерно 1 моль CH₃/моль тРНК. Для ковалентного присоединения азидо-тРНК или тРНК^{Phe} к т⁴А-метилазе комплекс получали в отсутствие S-аденозил-L-метионина, причем фермент брали примерно в 3–5-кратном избытке (в пересчете на субъединицы) по отношению к тРНК. Это соответствует практически эквимолярному соотношению фермент — тРНК, поскольку количество субъединиц на молекулу тРНК в составе комплекса варьирует от 3 до 8 [10]. В использованных условиях, как было показано ранее, большая часть тРНК должна находиться в комплексе с ферментом [10], что и наблюдалось при фильтрации комплексов через нитроцеллюлозные фильтры. Перед модификацией в тРНК вводили на 5'-конец ³²P-метку с помощью T4-полинуклеотидкиназы и [γ -³²P]АТР. В контрольных экспериментах процедуре модификации подвергали меченую аналогичным образом тРНК_I^{Val} из *E. coli*, не содержащую s^4U .

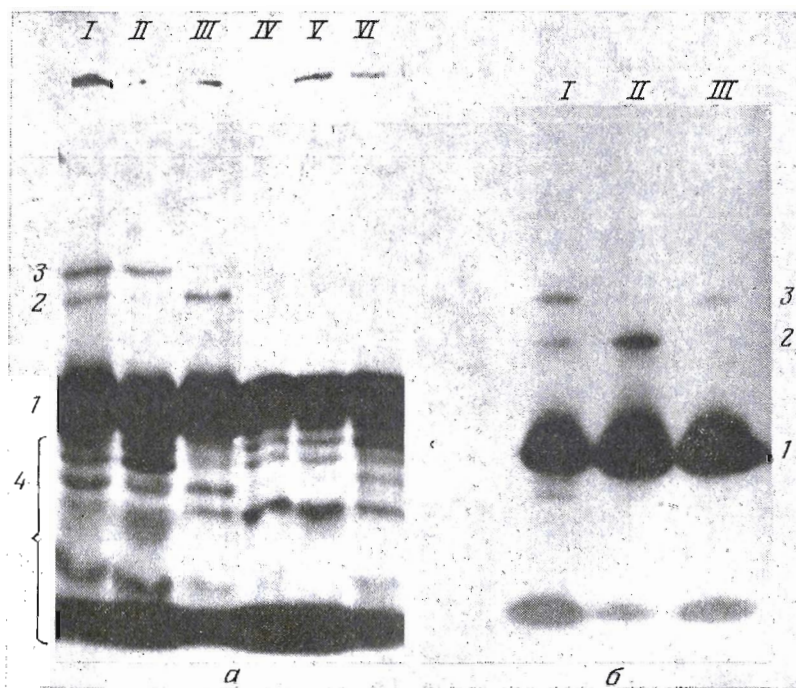


Рис. 2. Электрофорез в 12% ПААГ 5'-³²P-меченых тРНК и их комплексов с m¹A-метилазой после облучения. *а*: дорожка I — комплекс с азидо-тРНК; II — комплекс с тРНК^{Phe}; III — азидо-тРНК; IV — комплекс с тРНК^{Val}, обработанной 4-(ацетоксимеркуро)фенилазидом; V — комплекс с тРНК^{Val}; VI — тРНК^{Val}, обработанная реагентом. *б*: дорожки I и III соответствуют дорожкам I и II на рис. 2*а*. II — азидо-тРНК, облученная в присутствии m¹A-метилазы и 10-кратного избытка немеченой немодифицированной тРНК^{Phe}. Опыты серии *а* и *б* проведены с использованием разных партий m¹A-метилазы. Полосы 1–4 — см. таблицу

Комплексы обработанных реагентом и необработанных [³²P]тРНК с m¹A-метилазой облучали УФ-светом ($\lambda > 310$ нм) и анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия [11], в условиях диссоциации олигомерных белков на субъединицы (рис. 2). Из рис. 2*а* видно, что облучение комплексов тРНК^{Val} (обработанной или не обработанной реагентом) не приводит к появлению каких-либо сшивок (отсутствие полос между полосой [³²P]тРНК (I) и стартом). Наблюдается лишь некоторая деградация тРНК в результате обработок (полосы 4) ниже [³²P]тРНК. С другой стороны, при облучении комплексов азидо-[³²P]тРНК или [³²P]тРНК^{Phe} с m¹A-метилазой образуются два соединения, имеющие электрофоретическую подвижность меньшую, чем тРНК^{Phe} (полосы 2 и 3 на рис. 2*а, б*). Появление полос 2 в результате облучения наблюдается во всех случаях, причем наиболее заметно в отсутствие фермента. Очевидно, ее следует отнести к сшивкам внутри или между молекулами тРНК. Дополнительных исследований для выяснения характера этих сшивок в данной работе не проводили. Как видно из рис. 2*а*, эти сшивки в большей степени характерны для азидо-тРНК. Верхняя полоса 3 проявляется только при облучении комплексов тРНК с ферментом, и, следовательно, ее можно отнести к сшивке тРНК с субъединицей m¹A-метилазы. Образование сшивки азидо-тРНК с ферментом ингибируется при облучении в присутствии избытка немеченой тРНК^{Phe} (рис. 2*б*). Это свидетельствует о том, что сшивка азидо-тРНК с m¹A-метилазой происходит только в составе комплекса.

Из сравнения данных, приведенных на рис. 2*а* и *б*, видно, что степень ковалентного присоединения азидо-тРНК к ферменту при облучении выше, чем в случае тРНК^{Phe}. Это различие более заметно в случае 2*б* (эксперименты серии *а* и *б* проведены с различными партиями фермента).

Распределение радиоактивности (^{32}P) при электрофорезе облученных комплексов $m^1\text{A}$ -метилазы с азидо-тРНК (I), тРНК^{Phe} (II) и свободной облученной азидо-тРНК (III)

Полоса в геле (рис. 2)	Радиоактивность, от общего количества в дорожке, %		
	I	II	III
1 — тРНК	78	63	82
2 — тРНК *	0,7	0,2	0,7
3 — тРНК-фермент	1,0	0,6	—
4 — продукты деградации тРНК (в сумме)	21	36	17

Примечание. тРНК * — внутренние или межмолекулярные сшивки в тРНК.

Количественная обработка результатов приведена для серии *a*. Для этого из геля вырезали участки, соответствующие наблюдаемым полосам, и просчитывали радиоактивность по Черенкову. Результаты приведены в таблице.

Для строгого доказательства того, что при облучении комплексов тРНК^{Phe} с $m^1\text{A}$ -метилазой образуются ковалентные связи между субъединицей фермента и тРНК^{Phe}, проводили следующие эксперименты. Облученные комплексы подвергали исчерпывающему гидролизу РНКазой А, затем образующиеся олигонуклеотиды метили с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и Т4-полинуклеотидкиназы, полученные продукты разделяли электрофорезом в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и гели радиоавтографировали. Из рис. 3 видно, что в случае комплексов как с тРНК^{Phe}, так и с азидо-тРНК происходит включение метки в материал с подвижностью, близкой к подвижности субъединицы $m^1\text{A}$ -метилазы (ср. положение основной полосы на радиоавтографе и на фотографии этого же геля, окрашенного по белку). Небольшое смещение полосы, содержащей метку ^{32}P , относительно покрашенного белка естественно объяснить тем, что к субъединице фермента ковалентно присоединен олигонуклеотид. В эксперименте с азидо-тРНК полосы, соответствующие меченому ^{32}P материалу, вырезали, материал экстрагировали из геля, обессоливали и подвергали одной из следующих процедур: 1) обработке проназой Р; 2) обработке РНКазой Т₁; 3) обработке β-меркаптоэтанолом. После этого материал анализировали электрофорезом в ПААГ, содержащем 8 М мочевины, с последующей радиоавтографией. Как видно из рис. 4, при обработке пептидазной (проназой Р) происходит значительная фрагментация материала (дорожка II), что свидетельствует о наличии в нем полипептида. Обработка РНКазой Т₁ в условиях частичного гидролиза (дорожка IV) приводит к отщеплению очень коротких меченых фрагментов, по подвижности близких к моно- и динуклеотидам (ср. с щелочным гидролизом $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{тРНК}^{\text{Phe}}$, дорожка I). Этот результат можно объяснить следующим образом. После РНКазного гидролиза азидо-тРНК, ковалентно присоединенной к $m^1\text{A}$ -метилазе, и последующего мечения продуктов с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и полинуклеотидкиназы олигонуклеотид $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{GGAs}^4\text{Up}$ (если РНКазы А узнает модифицированный остаток $s^4\text{U}$) или $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{GGAs}^4\text{UAGGr}$ (если РНКазы А не узнает остаток $s^4\text{U}$) оказывается присоединенным к белку. В обоих случаях обработка РНКазой Т₁ должна приводить к отщеплению $[\text{32P}]\text{GGp}$ и $[\text{32P}]\text{Gr}$, что и наблюдается в эксперименте.

Таким образом, можно считать полностью обоснованным вывод о том, что облучение комплексов тРНК^{Phe} или азидо-тРНК с $m^1\text{A}$ -метилазой приводит к ковалентному присоединению тРНК^{Phe} к ферменту. Низкая эффективность прямой фотосшивки $s^4\text{U}^8$ с ферментом не удивительна, поскольку даже при наличии непосредственного контакта образование ковалентной связи между фотовозбужденным основанием тРНК и белком лимитируется жесткими стереохимическими ограничениями. Эффективность ковалентного присоединения азидо-тРНК к $m^1\text{A}$ -метилазе также не-

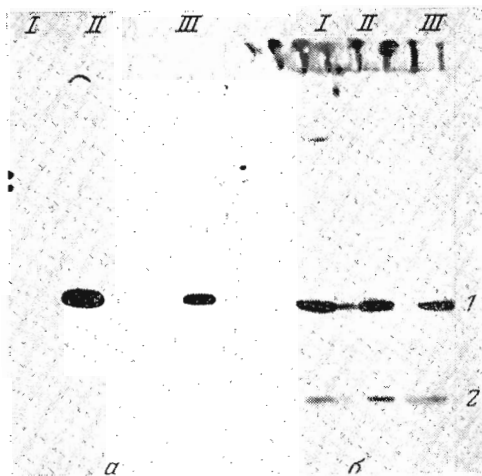


Рис. 3



Рис. 4

Рис. 3. Электрофорез в 12% ПААГ облученных комплексов м¹А-метилазы с азидо-тРНК (I) или тРНК^{Phe} (III) после обработки их РНКазой А и мечения продуктов ³²P с помощью Т4-полинуклеотидкиназы; II — препарат м¹А-метилазы. *a*: автордиограмма геля; *б*: фотография геля после окрашивания белка с помощью кумасси R-250 (1 — субъединица м¹А-метилазы, *M_r* 25 000; 2 — РНКаза А, *M_r* 12 000)

Рис. 4. Электрофорез в 22% ПААГ, содержащем 8 М мочевицу, ³²P-меченого матрикса, выделенного из облученного комплекса азидо-тРНК с м¹А-метилазой после обработки РНКазой А (III, см. рис. 3а, 1), и продуктов его обработки проназой Р (II), РНКазой Т₁ (IV) и β-меркаптоэтанолом (V); 1 — щелочной гидролизат 5'-³²P-тРНК^{Phe}. Цифры слева соответствуют длине олигонуклеотидов

велика и несколько ниже наблюдаемой ранее в случае присоединения к рибосомам производных тРНК с различными типами арилазидогрупп на остатке s⁴U^s [12]. Низкая эффективность фотоаффинной модификации фермента в данном случае может быть объяснена рядом причин. Во-первых, в реакционной смеси присутствовал β-меркаптоэтанол в концентрации 0,6 мМ, что должно приводить к сильному гашению нитренов [12].

Во-вторых, группировка $S-Hg-\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle-N_3$ очевидно, не обладает конформационной подвижностью (вращение вокруг связей S—Hg и Hg—C затруднено), поэтому фотолизированная группа не имеет возможности «выбирать» наиболее реакционноспособные участки в белке в радиусе длины фотоактивируемой группировки. Тем не менее для азидо-тРНК наблюдается несколько большая степень ковалентного присоединения к ферменту, чем для немодифицированной тРНК^{Phe}. Это различие качественно воспроизводимо. Тот факт, что присоединение происходит именно за счет остатка s⁴U^s или арилазидогруппы на нем, подтверждается отсутствием сшивок между ферментом и тРНК^{Val} (обработанной или не обработанной 4-(ацетоксимеркуро)фенилазидом), не содержащей остатка s⁴U (см. рис. 2).

Несколько неожиданным является тот факт, что обработка β-меркаптоэтанолом не приводит к отщеплению ковалентно присоединенного фрагмента азидо-тРНК от м¹А-метилазы (рис. 4, дорожка V). В случае свободной азидо-тРНК такая обработка приводит к количественному удале-

нию модифицирующей группы с остатка s^4U (см. рис. 1), хотя и в жестких условиях ($37^\circ C$, $2,5 M$ β -меркаптоэтанол). Очевидно, что достаточно небольшого уменьшения полярности (увеличения прочности) связи атома Hg с атомом S тиюридина, чтобы реакция с β -меркаптоэтанолом стала невозможной в приемлемом для биополимеров диапазоне концентраций и температур. Можно предположить, что именно такое изменение полярности связи Hg—S происходит в результате присоединения фотолизованной группы к белку вследствие перераспределения электронной плотности в кольце реагента.

Таким образом, данные фотоаффинной модификации и прямых сшивок в данном случае являются очень сходными (различия, возможно, существуют на уровне положения точки ковалентного присоединения в m^1A -метилазе) и подтверждают результаты, полученные ранее другими методами [6], о том, что район s^4U^8 тРНК^{Phe} контактирует с m^1A -метилазой в составе соответствующего специфического комплекса.

Экспериментальная часть

В работе использовали тРНК^{Phe} из *E. coli* (Boehringer Mannheim, ФРГ); тРНК^{Val} из дрожжей, выделенную по методике [13]; РНКазу T₁, РНКазу А и проназу Р (Serva, ФРГ); T₄-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент»); [γ - ^{32}P]АТР (Союзреактив). m^1A -метилазу выделяли из *Thermus thermophilus* согласно работе [5] и хранили при $-10^\circ C$ в буфере А (10 мМ трис-НСl, рН 8; 2 мМ MgCl₂, 0,25 М NaCl, 2 мМ β -меркаптоэтанол, 20% глицерин).

4-(Ацетоксимеркуро)фенилазид синтезировали как описано в работе [9]. ^{32}P -метку в тРНК и олигонуклеотиды вводили с помощью полинуклеотидкиназы и [γ - ^{32}P]АТР по методу [14].

Модификацию тРНК проводили путем инкубации тРНК (2 ОЕ₂₆₀/мл) с 4-(ацетоксимеркуро)фенилазидом (0,5 мМ) в водном растворе при $20^\circ C$ в течение 2 мин. Реагент добавляли в виде 30 мМ раствора в диметилформамиде. По окончании реакции к тРНК добавляли раствор ацетата натрия до 0,1 М и осаждали двумя объемами этанола при $-20^\circ C$, после чего дважды переосаждали. УФ-спектры записывали с помощью микроколлоидного хроматографа «Милихром» отечественного производства при концентрации тРНК 4,2 ОЕ₂₆₀/мл.

Нижний предел степени модификации тРНК^{Phe} (n , моль остатков реагента на 1 моль тРНК) оценивали по формуле

$$n = [\epsilon_0 - (\epsilon_{Hg} - \epsilon_{H_2O_2})] / \epsilon_0,$$

где ϵ_0 , ϵ_{Hg} и $\epsilon_{H_2O_2}$ — молярные коэффициенты поглощения при $\lambda = 337$ нм, исходной тРНК^{Phe}, модифицированной тРНК^{Phe} и тРНК^{Phe}, окисленной H₂O₂ (остаток s^4U превращается в остаток U). При этом пренебрегали поглощением модифицированного остатка s^4U при 337 нм, т. е. степень модификации занижена. В описанных условиях степень модификации (n) составляла не менее 0,8.

Функциональную активность тРНК по отношению к m^1A -метилазе определяли по катализируемому m^1A -метилазой в присутствии S-аденозин-^[14C]метноина включению радиоактивности в тРНК согласно [4].

Для получения комплексов [^{32}P]тРНК или азидо- ^{32}P тРНК с m^1A -метилазой к 30 мкг фермента (~1000 пмоль в пересчете на субъединицы) в 135 мкл буфера А добавляли 0,2 ОЕ₂₆₀ [^{32}P]тРНК (310 пмоль, 120 000 пмп/мин) в 50 мкл воды и 140 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, и 2 мМ MgCl₂. Инкубацию вели 5 мин при $4^\circ C$.

Комплексы облучали УФ-светом лампы ДРШ-1000 с кварцевым объективом. При этом реакционную смесь прокачивали через проточную охлаждаемую водой до $12^\circ C$ капилляр-кювету диаметром 1,5 мм со скоростью 60 мкл/мин. Кювета находилась в фокусе лампы. Стеклоянная рубашка кюветы (молибденовое стекло, толщина 2 мм) являлась светофильтром, пропускающим свет с $\lambda > 310$ нм. После облучения проводили концентрирование лиофилизацией до уменьшения объема в 5 раз.

Гидролиз РНКазой А вели при $37^\circ C$ в течение 3 ч. На $1/10$ часть облученного комплекса добавляли 0,5 мкг РНКазы.

Электрофорез в 12% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем додецилсульфат Na, проводили по методике [11] в пластинках (16×16 см) с толщиной слоя 0,6 мм.

Электрофорез прекращали, когда бромфеноловый синий доходил до нижней границы геля. Моченый материал элюировали из геля дистиллированной водой в течение 48 ч при $4^\circ C$, концентрировали лиофилизацией до ~50 мкл. Этот материал обессоливали на колонке ($V = 0,4$ мл) с сефадексом G-10, элюируя вели дистиллированной водой. Фракцию, выходящую в свободном объеме колонки, концентрировали лиофилизацией до объема ~15 мкл. Аликвоты по 5 мкл обрабатывали либо 0,2 ед. акт. РНКазы T₁ в течение 10 мин при $20^\circ C$, либо 0,5 мкг проназы Р в течение 3 ч при $37^\circ C$.

Электрофорез в 22% ПААГ с 8 М мочевиной проводили по [14] в пластинках (20×40 см) с толщиной слоя 0,3 мм. Электрофорез прекращали при прохождении бромфеноловым синим $2/3$ длины геля.

Авторы благодарны С. А. Казакову за участие в постановке работы и М. И. Добрикову за полезное обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rich A., Schimmel P. R. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 5. P. 1649–1655.
2. Ofengand J. // Ribosomes, structure, function and genetics/Eds Chambliss G., Craven G. R., Davies J., Davi K., Kahan L., Nomura M. Baltimore: University Park Press, 1980. P. 531–554.
3. Shershneva L. P., Venkstern T. V., Bayev A. A. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 294. № 2. P. 250–262.
4. Морозов И. А., Гамбарян А. С., Венкстern Т. В. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. Вып. 5. С. 1363–1368.
5. Morozov I. A., Gambaryan A. S., Lvova T. N., Nedospasov A. A., Venkstern T. V. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 129. № 2. P. 429–439.
6. Аффинная модификация биополимеров/Под ред. Д. Г. Кнорре. Новосибирск: Наука, 1983. С. 18–19, 112–117, 135–142.
7. Barritault D., Buckingham R. H., Favre A., Thomas G. // Biochimie. 1981. V. 63. № 7. P. 587–593.
8. Riehle N., Remy P., Ebel J.-P., Ehresmann B. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 128. № 2. P. 427–433.
9. Грачева Э. А., Шишкин Г. В. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1986. Вып. 5. № 5. С. 126–127.
10. Борисова О. Ф., Морозов И. А., Кузнецова Н. В., Гамбарян А. С., Венкстern Т. В. // Молекулярн. биология. 1986. Т. 20. Вып. 4. С. 1126–1137.
11. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
12. Hsu L. M., Lin F.-L., Nurse K., Ofengand J. // J. Mol. Biol. 1984. V. 4. № 1. P. 57–76.
13. Крюков В. М., Исаенко С. Н., Аксельрод В. Д., Баев А. А. // Молекулярн. биология. 1972. Т. 6. Вып. 6. С. 860–866.
14. Donnis-Keller H., Mazam A., Gilbert W. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2527–2538.

Поступила в редакцию

26.I.1987

После доработки

16.IV.1987

INTERACTION OF s^4U^8 REGION OF $tRNA^{Phe}$ WITH $tRNA$ (ADENIN-1)-METHYLTRANSFERASE FROM *THERMUS THERMOPHILUS*

VENKSTERN T. V.*, GRAIFER D. M., GRACHEVA E. A.,
KARPOVA G. G., MOROZOV I. A.*, SHISHKIN G. V.

*Institute of Bicorganic Chemistry, Siberian Branch, Academy of
Sciences of the USSR, Novosibirsk:*

**Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Photoaffinity labelling of $tRNA$ (adenine-1)-methyltransferase with an *E. coli* $tRNA^{Phe}$ derivative bearing 4-azidophenylmercurio group attached to s^4U residue as well as direct photocross-linking of the native $tRNA^{Phe}$ with the enzyme via s^4U residue has been studied. Both techniques labelling gave similar results, leading to covalent attachment of $tRNA^{Phe}$ to the enzyme within a specific complex. The data obtained indicate unambiguously that s^4U residue contacts with $tRNA$ (adenine-1)-methyltransferase within the corresponding specific complex.