



УДК 577.217.337.2

© 1990 г.

*З. М. Петрушенко, М. А. Тукало, О. Н. Гудзера,
О. Т. Рожко, Г. Х. Мацука*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УЧАСТКОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ tRNA^{Leu}_{LAG}
ИЗ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВ С ГОМОЛОГИЧНОЙ
АМИНОАЦИЛ-tRNA-СИНТЕТАЗОЙ МЕТОДОМ
ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ**

Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев

Определены участки контакта tRNA^{Leu}_{LAG}, имеющей длинную переменную ветвь, с гомологичной аминоацил-tRNA-синтетазой. Показано, что синтетаза защищает от алкилирования нитрозоэтилмочевинной 3'-фосфаты нуклеотидов 12—13 D-петли, 23—24 D-стебля, 37—43 антикодоновой ветви tRNA. Переменная ветвь и антикодон tRNA^{Leu}_{LAG} в зону контакта с Leu-tRNA-синтетазой не входят. Все участки взаимодействия с гомологичной Leu-tRNA-синтетазой имеют тенденцию к локализации со стороны D-стебля L-формы молекулы tRNA^{Leu}.

Транспортные РНК, участвуя в процессе белкового синтеза, взаимодействуют со многими биологическими макромолекулами. Наибольший интерес вызывает вопрос о молекулярных механизмах специфического взаимодействия tRNA с гомологичной аминоацил-tRNA-синтетазой. Один из основных выводов, к которому пришли многие исследователи этой проблемы, состоит в том, что закономерности, выявленные на одной паре tRNA — аминоацил-tRNA-синтетаза, нельзя механически переносить на другую [1]. Особый интерес представляют данные, касающиеся tRNA с длинной переменной ветвью, так как до последнего времени исследованы в основном комплексы аминоацил-tRNA-синтез с tRNA, имеющими короткую переменную ветвь, т. е. с tRNA первого класса.

В настоящей работе приведены результаты изучения участков контакта tRNA^{Leu}_{LAG} молочной железы коровы, одной из tRNA второго класса, с гомологичной аминоацил-tRNA-синтетазой, полученные с помощью модификации комплекса нитрозоэтилмочевинной.

Ранее Власовым было показано, что доступность фосфатных групп tRNA в зоне контакта с ферментом для алкилирования нитрозоэтилмочевинной затруднена [2, 3]. Стратегия алкилирования tRNA в присутствии аминоацил-tRNA-синтетазы была аналогична таковой для свободной tRNA и подразумевала обработку реагентом в условиях стабилизации пространственной структуры молекулы [2, 3], но преследовала также цель обеспечения наибольшего благоприятствования специфическому комплексообразованию: трис-HCl (pH 8,0), содержащий MgCl₂, дитиотреит, β-меркаптоэтанол при соотношении белок — tRNA 7,5 : 1 для 1 мкМ tRNA. Продукты расщепления нуклеиновой кислоты анализировали методом быстрого гель-секвенирования в полиакриламидном геле (рис. 1). Относительные реакционные способности остатков фосфорной кислоты tRNA^{Leu}, находящейся в комплексе с белком, рассчитывали из денситограмм соответствующих электрофоретических треков. Из рис. 2, 3 видно, что Leu-tRNA-синтетаза защищает от алкилирования нитрозоэтилмочевинной ряд межнуклеотидных фосфатов tRNA^{Leu}_{LAG}, сгруппированных в трех зонах: 3'-фосфаты нуклеотидов 12, 13 D-петли, 23—24 D-стебля, 37—43 антикодоновой ветви. Положение этих фосфатов в структуре tRNA показано на рис. 4. Остатки фосфорной кислоты антикодона и переменной ветви от

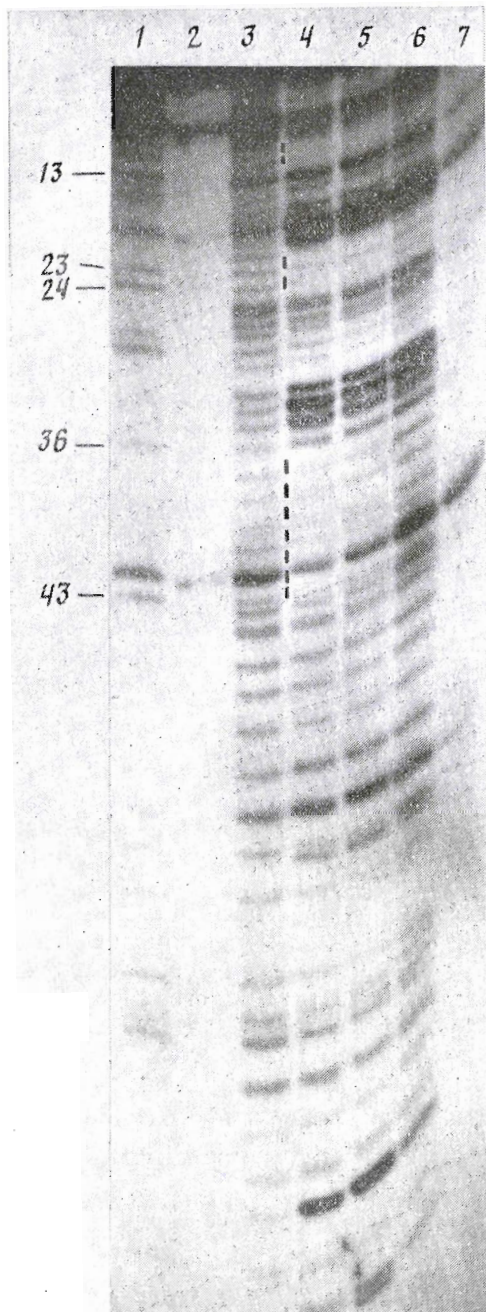


Рис. 1. Радиоавтограф полиакриламидного геля после разделения фрагментов, полученных в результате расщепления $3'$ - ^{32}P -меченой $\text{tRNA}_{\text{IAG}}^{\text{Leu}}$, алкилированной нитроэтилмочевинной в стабилизирующих условиях (3), в присутствии гомологичной Leu - tRNA -синтетазы (4, 5) или бычьего сывороточного альбумина (6). 2, 7 — tRNA , выдержанная соответственно в условиях треков 3, 4, но без реагента. 1 — tRNA , частично гидролизованная рибонуклазой T_1 . Штриховой линией отмечены полосы в треке 4, отличающиеся по интенсивности от соответствующих полос трека 3. Цифры слева — номера $3'$ -фосфатов соответствующих нуклеотидов

модификации не защищаются. Метод химической модификации комплекса нитроэтилмочевинной не позволяет получить информацию об участии в контакте с аминоксил- tRNA -синтетазой фосфатов акцепторного стебля tRNA , так как в ходе эксперимента не удается достичь количественного осаждения коротких олигонуклеотидов.

В качестве контроля специфичности комплексообразования мы проводили реакцию алкилирования $\text{tRNA}_{\text{Leu}}^{\text{Leu}}$ молочной железы коровы в присутствии Ser - tRNA -синтетазы из печени быка, бычьего сывороточного альбумина и Leu - tRNA -синтетазы из дрожжей (рис. 1, 3). Было обнаружено, что первые два белка не защищают остатки фосфорной кислоты $\text{tRNA}_{\text{Leu}}^{\text{Leu}}$ от модификации. Дрожжевая лейцил- tRNA -синтетаза взаимодействует с теми же участками $\text{tRNA}_{\text{Leu}}^{\text{Leu}}$ молочной железы коровы, что и гомологичная аминоксил- tRNA -синтетаза (рис. 3).

Таким образом, в $\text{tRNA}_{\text{Leu}}^{\text{Leu}}$, как и в других исследованных tRNA [2—6],

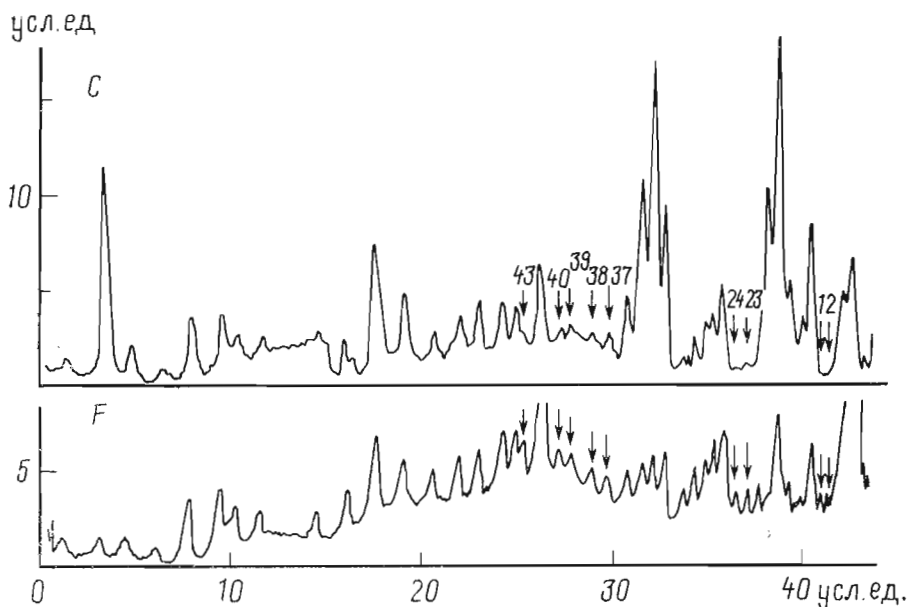


Рис. 2. Денситограмма радиоавтографа, показанного на рис. 1. С — дорожка 4, F — дорожка 3. Стрелками отмечены остатки фосфорной кислоты $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{IAG}}$, имеющие пониженный уровень модификации в присутствии гомологичной аминоксил-тРНК-синтетазы

в контакте с гомологичной аминоксил-тРНК-синтетазой находится не один участок, а несколько удаленных друг от друга в первичной структуре. На рис. 5 остатки фосфорной кислоты $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{IAG}}$, защищаемые от модификации Leu-тРНК-синтетазой, изображены на обобщенной Сундарилингамом модели пространственной структуры тРНК второго класса [7]. Исходя из расположения этих фосфатов, можно сделать вывод, что $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{IAG}}$ молочной железы коров взаимодействует с гомологичной аминоксил-тРНК-синтетазой одной стороной, противоположной той, из которой выходит переменная ветвь.

Результаты настоящей работы хорошо соответствуют данным, полученным нами при изучении защиты $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{IAG}}$ Leu-тРНК-синтетазой из молочной железы коров от гидролиза экзонуклеазой яда кобры. Так, в работе [8] наблюдали защиту 3'-стороны антикодона стебля; было также показано, что Leu-тРНК-синтетаза не защищает антикодон $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{IAG}}$ от гидролиза различными нуклеазами.

Интересно сравнить результаты, полученные нами при изучении взаимодействия $\text{tRNA}^{\text{Leu}}_{\text{IAG}}$ с гомологичной синтетазой, с данными других авторов. Опубликованные работы такого рода касаются тРНК, имеющих короткую переменную петлю. С помощью метода защиты фосфатов тРНК аминоксил-тРНК-синтетазой от алкилирования нитрозоэтилмочевинной были изучены несколько гомологичных пар: фенилаланиновая, валиновая [2, 3], аспарагиновая [5] из дрожжей, триптофановая из печени быка [6] и треониновая из *E. coli* [4]. В tRNA^{Phe} дрожжей Phe-тРНК-синтетаза защищает от алкилирования ряд фосфатов по всей структуре молекулы. Причем эти фосфаты расположены как на внутренней, так и на внешней стороне L-формы тРНК. В валиновой паре в зону контакта с аминоксил-тРНК-синтетазой входят протяженные участки 3'-стороны антикодона ветви, переменной петли и ряд фосфатов D-ветви; фермент как бы охватывает молекулу тРНК с двух сторон. В tRNA^{Tyr} с гомологичной аминоксил-тРНК-синтетазой взаимодействует 5'-сторона антикодона стебля и 3'-сторона акцепторного стебля. В аспарагиновой паре в зону контакта с синтетазой входят довольно протяженные участки тРНК: 5'-сторона антикодона, D- и TΨC-стеблей, а также переменная петля. В целом все участки взаимодействия расположены с одной стороны тела

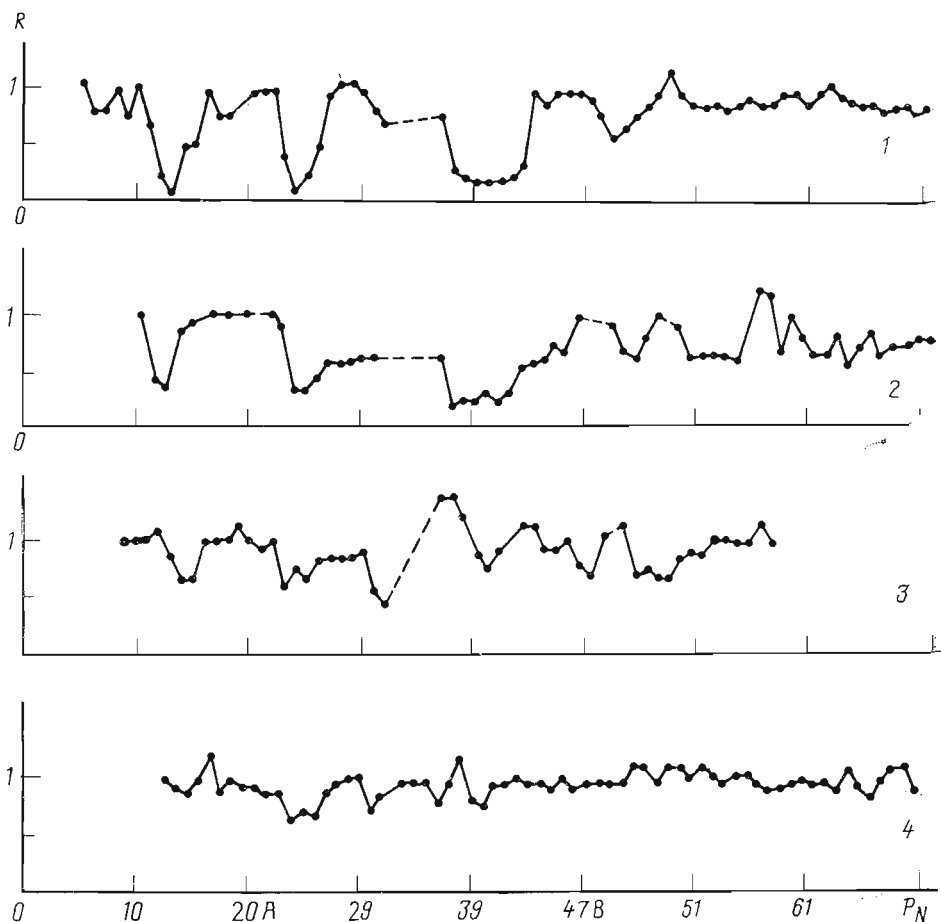


Рис. 3. Отношение реакционной способности остатков фосфорной кислоты (R) в $\text{tRNA}_{\text{TAG}}^{\text{Leu}}$ при ее алкилировании нитрозоэтилмочевинной в присутствии гомологичной Leu-тРНК-синтетазы (1), дрожжевой Leu-тРНК-синтетазы (2), бычьего сывороточного альбумина (3) и Ser-тРНК-синтетазы из печени быка (4) к реакционной способности соответствующих фосфатов в свободной тРНК. P_N — номера фосфатов

тРНК^{Asp} (на которой расположена переменная петля). В треониновой тРНК гомологичная аминокислот-тРНК-синтаза защищает от модификации фосфаты 3'-стороны акцепторного и D-стеблей, 5'-стороны переменной петли, антикодонного и ТΨС-стеблей.

Недавно были получены сведения об участках контакта с гомологичной аминокислот-тРНК-синтазой еще одного представителя тРНК второго класса — лейциновой тРНК фасоли (Р. Жъеже, личное сообщение). Обнаруживается хорошее совпадение участков контакта с Leu-тРНК-синтазой этой тРНК и тРНК^{Leu} молочной железы коров. Фермент из фасоли защищает от алкилирования нитрозоэтилмочевинной 3'-фосфаты нуклеотидов 10—12, 22—25, 38—44.

Полученные нами результаты вместе с данными других авторов показывают, что каждая из исследованных тРНК взаимодействует с гомологичной аминокислот-тРНК-синтазой по-разному. По-видимому, модель, предложенная Ричем и Шиммельем [9], которая предполагает, что тРНК взаимодействует с аминокислот-тРНК-синтазой внутренней стороной L-формы молекулы, является частным случаем топографии тРНК-ферментного комплекса.

Экспериментальная часть

В работе использовали $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с уд. акт. 2000—3000 Ки/ммоль (Amersham, Англия), $\text{T}_1\text{-RNKазу}$ (КФ 3.1.27.3; Sankyo, Япония). Нитрозоэтилмочевина синтезирована А. Г. Терентьевым (ИМБГ АН УССР).

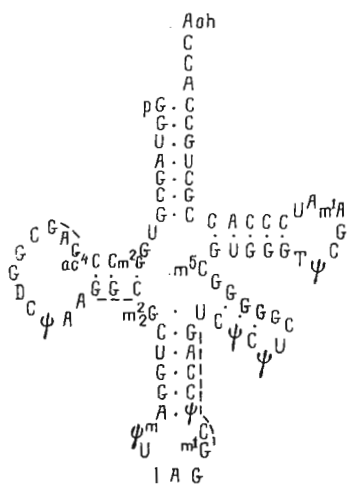


Рис. 4

Рис. 4. Структура тРНК^{Leu}_{IAG} в виде клеверного листа. Штриховой линией отмечены участки тРНК, защищаемые лейцил-тРНК-синтетазой от алкилирования нитрозоэтилмочевинной



Рис. 5

Рис. 5. Модель пространственной структуры тРНК второго класса, предложенная Сундаралингамом [7]. Треугольниками показаны фосфаты тРНК^{Leu}_{IAG} молочной железы коров, защищаемые лейцил-тРНК-синтетазой от алкилирования нитрозоэтилмочевинной

Препарат индивидуальной тРНК^{Leu}_{IAG} выделяли из суммарной тРНК лактирующей молочной железы коров методами, описанными нами ранее [10].

Leu-тРНК-синтетаза молочной железы коров 75%-ной чистоты была получена в результате следующих стадий очистки: 1) хроматография клеточного экстракта на колонке с DEAE-целлюлозой в трис-HCl-буфере, pH 7,8; 2) дробное высаливание белков сульфатом аммония; 3) хроматография сульфат-аммонийного осадка, содержащего лейцилакцептирующую активность, на колонке с DEAE-целлюлозой в калий-фосфатном буфере, pH 7,2; 4) гель-фильтрация на ультрагеле АСА-34; 5) хроматография на гидроксипатите; 6) хроматография на колонке с гидрофобным наполнителем — диаминооктил-сефарозой.

Leu-тРНК-синтетазу дрожжей выделяли согласно работе [11].

тРНК^{Leu}_{IAG}, ³²P-меченную по 3'- и 5'-концу, получали как описано в работах [12] и [13] соответственно, используя щелочную фосфатазу из *E. coli* (КФ 3.1.3.1; Worthington, США), полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), выделенную из клеток *E. coli*, инфицированных фагом Т4 (Boehringer, ФРГ), и тРНК-нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.2.1), любезно предоставленную Р. Жьеже (Институт молекулярной и клеточной биологии, Страсбург).

Алкилирование меченой тРНК нитрозоэтилмочевинной в условиях, стабилизирующих пространственную структуру молекулы, проводили как описано нами в работе [14].

Алкилирование меченой тРНК (1 мкМ) в присутствии фермента или бычьего сывороточного альбумина (по 7,5 мкМ) проводили в 25 мл 50 мМ трис-HCl (pH 8,0), содержащего 5 мМ MgCl₂, 5 мМ меркаптоэтанол, 0,2 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA, добавляя 2,5 мкл насыщенного раствора нитрозоэтилмочевинны и выдерживая 2 ч при 23° С. Контрольный эксперимент проводили, добавляя эквивалентный объем чистого этанола. Для остановки алкилирования и осаждения тРНК в реакционную смесь добавляли 6 мкл 1,5 М ацетата натрия, 10 мг суммарной тРНК и 100 мкл дважды перегнанного этанола.

Расщепление полинуклеотидной цепи по модифицированным фосфатам проводили 5 мин в трис-HCl-буфере (pH 9,0) при 55° С. Фрагменты тРНК

осаждали подкислением раствора ацетатом натрия и добавлением этанола. Полученные образцы расщепленной тРНК анализировали гель-электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле в 0,05 М трис-боратном буфере, pH 8,3, содержащем 1 мМ EDTA и 8 М мочевины. Отнесение электрофоретических полос проводили сравнением их подвижности с подвижностью фрагментов тРНК, полученных путем частичного гидролиза ее рибонуклеазой T₁. Радиоавтографы гелей сканировали на микроденситометре Joyce, Loebl (Англия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК. М.: Наука, 1984. 408 с.
2. Vlassov V. V., Giegé R., Kern D., Romby P., Ebel J. P. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 132. № 3. P. 537—544.
3. Vlassov V. V., Kern D., Giegé R., Ebel J. P. // FEBS Lett. 1981. V. 123. № 2. P. 277—281.
4. Theobald A., Springer M., Grunberg-Manago M., Ebel J. P., Giegé R. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 175. № 3. P. 511—524.
5. Romby P., Moras D., Bergdoll M., Dumas P., Vlassov V. V., Westhof E., Ebel J. P., Giegé R. // J. Mol. Biol. 1985. V. 184. № 3. P. 455—471.
6. Garret M., Labouesse B., Lilvac S., Romby P., Ebel J. P., Giegé R. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 138. № 1. P. 67—75.
7. Brennan T., Sundaralingam M. // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. № 11. P. 3235—3251.
8. Matsuka G. Kh., Tukul M. A., Petrushenko Z. M., Kriklivity I. A., Rozchko O. T., Kalachnyuk L. G. // 14 the Int. Congr. of Biochemistry: Abstracts. Prague, 1988. V. 5. FR: 454. P. 157.
9. Rich F., Schimmel P. R. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 15. P. 1649—1665.
10. Тукало М. А., Васильева Н. Г., Турковская Г. В., Ельская А. В. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 12. С. 1984—1987.
11. Kern D., Giegé R., Ebel J. P. // Biochim. et biophys. acta. 1969. V. 186. № 1. P. 33—45.
12. Silberklang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 12. P. 4091—4108.
13. Vlassov V. V., Giegé R., Ebel J. P. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 119. № 1. P. 51—59.
14. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1492—1497.

Поступила в редакцию
22.XI.1989

Z. M. PETRUSHENKO, M. A. TUKALO, O. I. GUDZERA,
O. T. ROZCHKO, G. KH. MATSUKA

IDENTIFICATION OF INTERACTION SITES OF tRNA^{Leu} FROM COW MAMMARY GLAND WITH THE COGNATE AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE BY THE CHEMICAL MODIFICATION METHOD

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev*

The interaction of the cow mammary gland tRNA^{Leu}_{IAG}, having a long variable loop, with the cognate aminoacyl-tRNA synthetase has been studied by the alkylation with ethylnitrosourea. It was shown that leucyl-tRNA synthetase protects from alkylation 3'-phosphates of the nucleotides 12—13 in D-loop, 23—24 in D-stem and 37—43 in the anticodon arm of tRNA^{Leu}_{IAG}. All regions of interaction with the aminoacyl-tRNA synthetase are located in the same plane of tRNA whereas the long variable loop is in another plane.