



УДК 577.217.337.2

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УЧАСТКОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ тРНК^{Tyr} ИЗ *Thermus thermophilus* И *Escherichia coli* С ГОМОЛОГИЧНЫМИ АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗАМИ МЕТОДАМИ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ И НУКЛЕАЗНОГО ГИДРОЛИЗА

© 1998 г. С. П. Егорова, А. Д. Яремчук, И. А. Крикливый, М. А. Тукало[#]

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, 252143, Киев, ул. Заболотного, 150

Поступила в редакцию 02.12.97 г.

Принята к печати 07.04.98 г.

Определена нуклеотидная последовательность тРНК^{Tyr} из экстремального термофила *Thermus thermophilus* НВ-27, живущего при 75°C. Она имеет длину 86 нт, и степень ее гомологии с тРНК^{Tyr} из *Escherichia coli* составляет 52%. Методами химической модификации и нуклеазного гидролиза проведен сравнительный анализ участков взаимодействия тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* и *E. coli* с гомологичными аминоксил-тРНК-синтетазами. Показано, что тРНК^{Tyr} контактирует с гомологичным ферментом в области антикодонового стебля (с 5'-стороны), в антикодоне, в районах варибельного стебля и варибельной петли (с 5'-стороны) и акцепторного стебля (с 3'-стороны). В пространственной структуре тРНК^{Tyr} эти участки расположены в области варибельного стебля L-формы. В тРНК^{Tyr} из *E. coli* при образовании комплекса с гомологичной синтетазой обнаружена индукция дополнительных разрывов фосфодиэфирных связей эндонуклеазой V₁ с 3'-стороны антикодонового стебля и 5'-стороны Т-стебля, что указывает на возможное изменение конформации тРНК при взаимодействии с ферментом.

Ключевые слова: аминоксил-тРНК-синтетаза; тРНК; РНК-белковые взаимодействия.

Точность биосинтеза белка зависит от правильного аминокислотирования тРНК соответствующими аминокислотами. Эта реакция катализируется аминоксил-тРНК-синтетазами, которые специфически узнают гомологичную аминокислоту и тРНК. Для понимания механизма специфического узнавания тРНК синтетазами необходимо знание пространственной структуры соответствующих РНК-белковых комплексов. К настоящему времени детальная структурная информация о тРНК-синтетазных комплексах известна для трех систем. Это глутаминовая система из *Escherichia coli* для 1-го структурного класса синтетаз [1, 2], а также аспартиловая система из дрожжей [3, 4] и сериновая система из *Thermus thermophilus* [5, 6] для синтетаз 2-го класса. Несмотря на то что структуры этих трех комплексов демонстрируют очень разные типы взаимодействия тРНК и фермента, можно сделать обобщение, что синтетазы двух разных классов взаимодействуют с тРНК с противоположных сторон: синтетазы 1-го класса – со стороны D-петли, а синтетазы 2-го класса – со стороны варибельной петли.

Исучаемая нами тирозил-тРНК-синтетаза относится к 1-му структурному классу синтетаз [7]. В случае прокариот тРНК^{Tyr} имеет длинную варибельную петлю. К настоящему времени рентгеноструктурные данные по комплексу тирозил-тРНК-синтетазы с тРНК^{Tyr} отсутствуют и тип взаимодействия не установлен. Целью данной работы было сравнительное изучение участков взаимодействия тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* и *E. coli* с гомологичными тирозил-тРНК-синтетазами с использованием методов химической модификации и нуклеазного гидролиза.

На первом этапе была определена первичная структура тРНК^{Tyr} из экстремального термофила *T. thermophilus* НВ-27, живущего при 75°C. Для этой цели применяли два взаимодополняющих метода: метод быстрого гель-секвенирования с использованием специфической химической дегградации по Питти [8] и метод нуклеазного сиквенса [9, 10]. Совокупность данных, полученных этими методами, позволила установить полную нуклеотидную последовательность термофильной тРНК^{Tyr} (рис. 1). тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* НВ-27 отличается по первичной структуре от своего гомолога из *T. thermophilus* НВ-8 в положении 9, где в последнем случае находится гуанозин [11] (в случае НВ-27 это уридин). При сравнении нуклеотидной последовательности тРНК^{Tyr} из *T. ther-*

[#] Автор для переписки (e-mail: tukalo@imbg.kiev.ua).

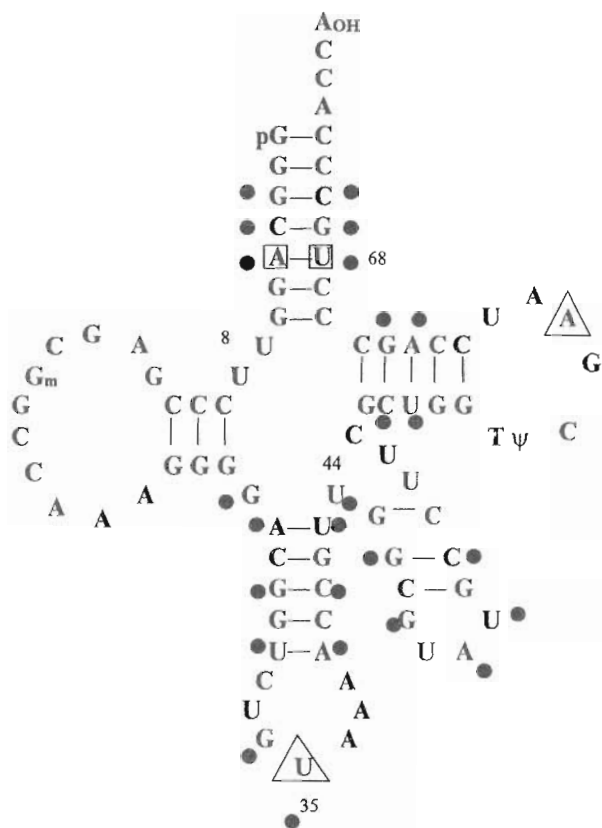


Рис. 1. Первичная структура тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* HB-27. Точками обозначены нуклеотиды, которыми термофильная тРНК^{Tyr} отличается от тРНК^{Tyr} из *E. coli*. В прямоугольной рамке – нуклеотиды, которыми тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* отличается от нуклеотидных остатков, общих для тРНК^{Tyr} из *E. coli*, *B. stearothermophilus*, митохондрии *N. crassa* и митохондрии дрожжей, в треугольной – модифицированные нуклеотиды.

thermophilus HB-27 с ранее установленной структурой тРНК^{Tyr} из *E. coli* [12] обнаружены различия в 26 положениях: 6 – в акцепторном стебле, 1 – между D-стеблем и антикодоновым стеблем, 6 – в антикодоновом стебле, 2 – в антикодоновой петле, 1 – между антикодоновым стеблем и вариабельным стеблем, 2 – в вариабельном стебле, 3 – в вариабельной петле, 4 – в Т-стебле, 1 – в Т-петле.

Сравнение нуклеотидных остатков, общих для тРНК^{Tyr} из *E. coli*, *Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis*, митохондрий *Neurospora crassa* и дрожжей [13] с нуклеотидными остатками в соответствующих положениях тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* HB-27 показало, что они различаются в 5-м и 68-м положениях акцепторного стебля. Одним из наиболее важных различий между первичными структурами тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* и *E. coli* является присутствие в 1-м положении антикодона термофильной тРНК^{Tyr} гуанозина. В случае мезофильной тРНК в этом положении находится

кьюозин (Q), характерный для первой позиции антикодонов таких тРНК, как тРНК^{Asp}, тРНК^{Asn}, тРНК^{His} и тРНК^{Tyr} бактерий и дрожжей [14]. Во 2-м положении антикодона и 58-м положении Т-петли термофильной тРНК^{Tyr} находятся модифицированные нуклеозиды (природа модификации не установлена), тогда как в случае *E. coli* – уридин и аденозин соответственно.

Еще на одно различие в антикодоновом стебле следует обратить внимание: замена пары А³¹ – Ψ³⁹ в тРНК^{Tyr} *E. coli* на пару У³¹-А³⁹ в случае *T. thermophilus*. Пара А³¹ – Ψ³⁹ в антикодоновом стебле способствует большей подвижности антикодоновой петли в молекуле мезофильной тРНК^{Tyr}.

Участки взаимодействия тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* и *E. coli* с гомологичными и гетерологичными аминоксил-тРНК-синтетазами изучали методом сравнительного анализа продуктов химической модификации и нуклеазного гидролиза свободных тРНК и их комплексов с ферментами. Ранее было показано, что алкилирование нитрозоэтил-мочевинной фосфатных групп тРНК затруднено в местах контакта с ферментом [15, 16]. Поэтому химическая модификация тРНК в присутствии аминоксил-тРНК-синтетазы велась как в условиях стабилизации пространственной структуры тРНК [15, 16], так и в условиях, способствующих образованию специфичного комплекса тРНК–белок (см. “Экспериментальную часть”). Соотношение белок–тРНК составляло 4 : 1. Полученные образцы после расщепления тРНК анализировали методом быстрого гель-секвенирования в ПААГ (рис. 2).

Интенсивности электрофоретических полос, отражающие степень модификации фосфатов, определяли с помощью сканирующего денситометра. Из кривой расчета денситограмм видно (рис. 3), что термофильная тирозил-тРНК-синтетаза защищает от алкилирования фосфаты тРНК^{Tyr}, расположенные в четырех районах: 3'-фосфаты нуклеотидов в позициях 28 и 29 с 5'-стороны антикодонового стебля, 34 и 36 антикодона, 45, 46 и 47 вариабельной ветви, в позиции 68 с 3'-стороны акцепторного стебля. Для мезофильной пары места защиты также расположены в четырех районах: 3'-фосфаты нуклеотидов в положениях 29 с 5'-стороны антикодонового стебля, 36 – в антикодоне, 45 и 46 вариабельной ветви, 67 с 3'-стороны акцепторного стебля. Положение этих фосфатов в структуре тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* и *E. coli* показано на рис. 4. Данным методом не удалось получить информацию о фосфатах акцепторного стебля тРНК, контактирующих с белком, так как количественного осаждения коротких олигонуклеотидов экспериментально не удается достичь. В мезофильной и термофильной тРНК^{Tyr} отсутствует информация о 3'-фосфате нуклеотида Gm в 18-м положении, содержащего

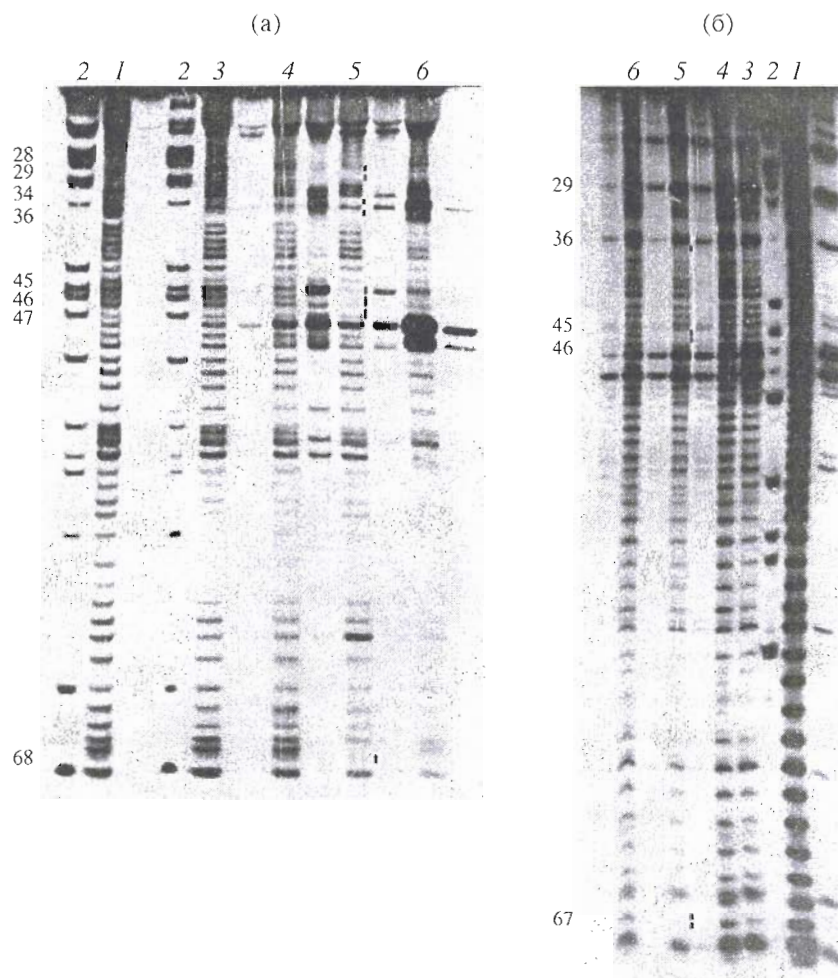


Рис. 2. Радиоавтограф ПААГ после разделения фрагментов, полученных в результате расщепления 3^{\prime} - ^{32}P -меченых тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б), алкилированных нитроэтилмочевинной в денатурирующих (1) и стабилизирующих условиях (3, 4), в присутствии гомологичной Tyr-тРНК-синтетазы (5), Pro-тРНК-синтетазы (6а) или Lys-тРНК-синтетазы (6б). Дорожки 2 (а, б) – тРНК, частично гидролизованые рибонуклеазой T₁. Цифры слева – номера 3'-фосфатов соответствующих нуклеотидов.

остаток 2'-O-метилрибозы, что препятствует расщеплению этого фосфотриэфира. Также отсутствует информация о реакционной способности фосфатов термофильной тРНК^{Tyr}, расположенных в двух зонах: 3'-фосфаты нуклеотидов 33 и 35 антикодоновой петли, а также 47В, 47D вариabельной ветви. Для мезофильной тРНК^{Tyr} это 3'-фосфаты нуклеотидов: 28-го с 5'-стороны антикодонового стебля, 35-го – антикодона, 47-го и 47В-го – вариabельной ветви. В вышеуказанных местах в ходе эксперимента в молекуле тРНК возникают спонтанные разрывы, которые не дают возможность реально определить степень модификации фосфатных остатков. При разделении фрагментов термофильной тРНК^{Tyr} наблюдался эффект “сжатия” электрофоретических полос, соответствующих району 3'-стороны антикодонового стебля, 5'-стороны вариabельного и 5'-стороны Т-стебля (U⁴³ и U⁴⁴, G⁴⁹ и C⁵⁰, U⁵¹ и G⁵²),

и эффект нарушения подвижности электрофоретических полос, соответствующих району 3'-стороны вариabельного и 5'-стороны Т-стебля (между положениями 47Н и 50).

Для контроля специфичности образования комплекса тРНК–синтетаза была проведена реакция алкилирования тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* и *E. coli* в присутствии пролил-тРНК-синтетазы и лизил-тРНК-синтетазы из *T. thermophilus* (рис. 2). Обнаружено, что неспецифические синтетазы не защищают тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* и *E. coli* от модификации.

Для получения дополнительной и независимой информации о местах контакта термофильной и мезофильной тРНК^{Tyr} с гомологичными синтетазами использовали также метод сравнения продуктов нуклеазного гидролиза тРНК в свободном виде и в составе комплексов с синтетазами. Для гидролиза, который вели в условиях, оптималь-

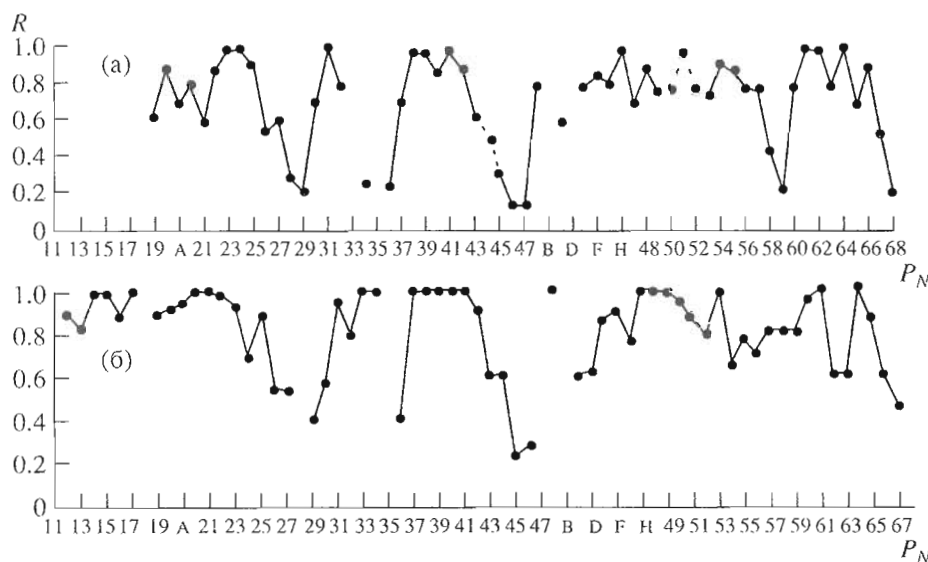


Рис. 3. Отношение реакционной способности остатков фосфорной кислоты (R) в тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* (а) или *E. coli* (б) при алкилировании нитрозоэтилмочевинной в присутствии гомологичной Tyr-тРНК-синтетазы к реакционной способности соответствующих фосфатов в свободной тРНК. P_N – номера фосфатов.

ных для образования тРНК-синтетазных комплексов (см. «Экспериментальную часть»), применяли РНКазы P_1 , $PhyM$ и V_1 . Соотношение белок-тРНК составляло 4 : 1. Полученные фрагменты тРНК анализировали гель-электрофорезом в ПААГ (рис. 5). От гидролиза тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* рибонуклеазами P_1 , $PhyM$ и V_1 гомологичная синтетазы защищает фосфодиэфирные связи между нуклеотидами 28 и 29, 29 и 30 с 5'-стороны антикодонового стебля, 33 и 34, 34 и 35 антикодоновой петли, 47В и 47С, 47С и 47D варибельной петли, 68 и 69, 69 и 70, 70 и 71, 71 и 72, 72 и 73, 73 и 74 с 5'-стороны акцепторного стебля. Для мезофильной пары защищаются фосфодиэфирные связи между нуклеотидами 29 и 30 с 5'-стороны антикодонового стебля, 35 и 36, 36 и 37 антикодоновой петли, 47А и 47В, 47С и 47D варибельной петли, 67 и 68 с 3'-стороны акцепторного стебля. В случае гидролиза тРНК^{Tyr} *E. coli* нуклеазой V_1 в присутствии гомологичной синтетазы наблюдалась сильная индукция разрывов фосфодиэфирных связей между нуклеотидами 40 и 41 (с 3'-стороны антикодонового стебля), а также 52 и 53 (в Т-стебле). Возможно, что в молекуле тРНК при взаимодействии с гомологичной синтетазой происходят определенные конформационные изменения. В случае термофильной тРНК^{Tyr} индукция разрывов фосфодиэфирных связей не наблюдалась.

Положение фосфатов в структуре тРНК^{Tyr} *T. thermophilus* и *E. coli*, контактирующих с гомологичной синтетазой и выявленных при нуклеазном гидролизе, показано на рис. 4. Видно, что места контакта тРНК с синтетазой, как и в случае использования метода химической модификации,

расположены в основном в тех же четырех зонах: с 5'-стороны антикодонового стебля, в антикодоне, в варибельной петле и с 3'-стороны акцепторного стебля. Как и следовало ожидать, результаты, полученные с использованием двух методов, не полностью совпадают, что связано с различной специфичностью и размерами «инструментов». При сравнении мест контактов, полученных для термофильной и мезофильной тРНК-синтетазных пар, можно отметить большую протяженность участка с 3'-стороны акцепторного стебля тРНК^{Tyr} *T. thermophilus*, защищаемого гомологичной синтетазой от гидролиза V_1 -нуклеазой.

Обобщая результаты, полученные с использованием двух различных методов на двух парах тРНК^{Tyr}-тирозил-тРНК-синтетазы, можно заключить, что в тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* и *E. coli* в контакте с гомологичной синтетазой находится несколько удаленных друг от друга в первичной структуре участков. Их расположение на модели пространственной структуры тРНК^{Tyr} однозначно указывает на то, что синтетазы взаимодействуют с тРНК со стороны варибельного стебля. К такому же заключению пришли Bedouelle и др. [17, 18] при создании модели комплекса тирозил-тРНК-синтетазы и тРНК^{Tyr} из *B. stearothermophilus*. Модель была создана на основе анализа кристаллической структуры тирозил-тРНК-синтетазы из *B. stearothermophilus* и дрожжевой тРНК^{Phe} с использованием многочисленных данных по мутагенезу тРНК и фермента [18, 19]. Авторы модели предполагают, что тирозил-тРНК-синтетазы подходят к тРНК со стороны варибельной петли и большой борозды акцепторного стебля тРНК. Следует также отметить, что акцепторный конец тРНК

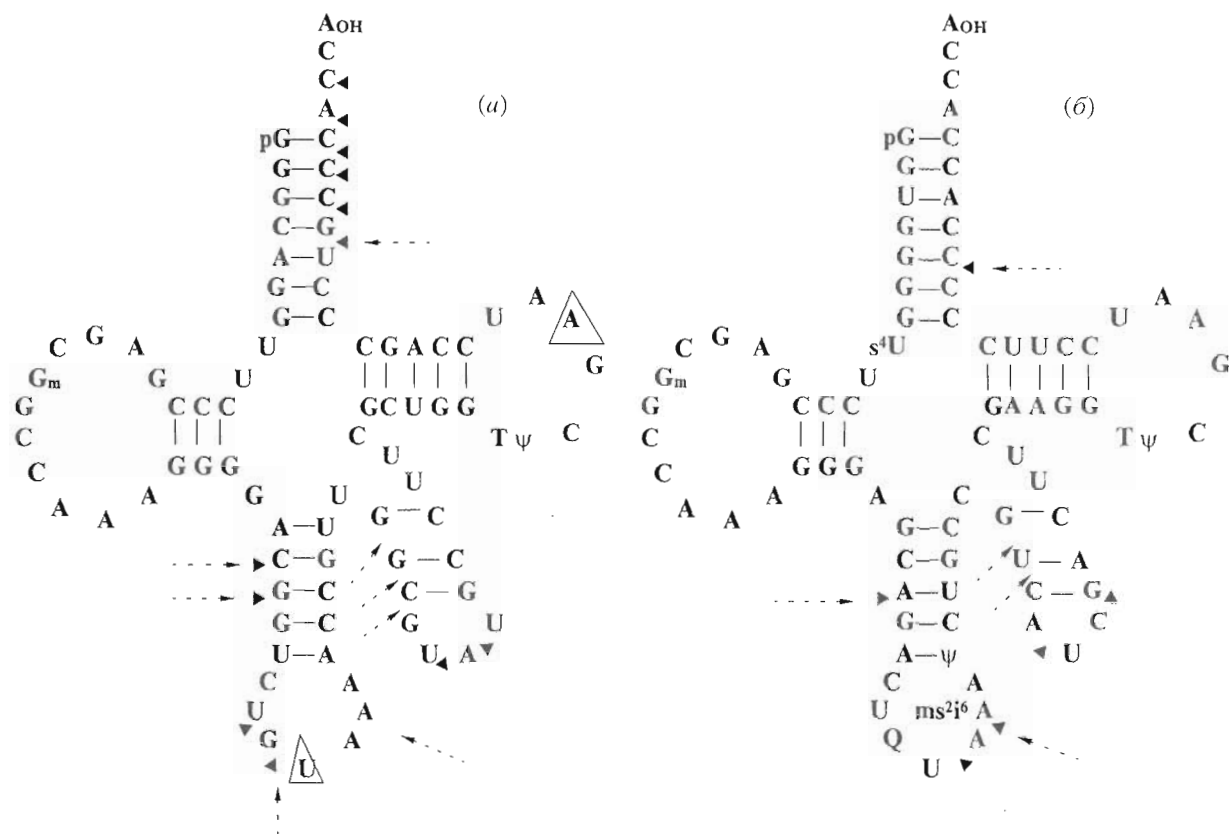


Рис. 4. Структура тРНК^{Tyr} из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б) в виде клеверного листа: стрелками показаны фосфаты тРНК, защищаемые гомологичной тирозил-тРНК-синтетазой от алкилирования нитрозостилмочевинной (к защищаемым фосфатам относятся те, у которых относительная реакционная способность падала более чем на 50%); в треугольных рамках – фосфаты тРНК, защищаемые тирозил-тРНК-синтетазой от гидролиза нуклеазами P₁, V₁ и РhуМ (см. рис. 5).

в этой модели имеет конформацию, обнаруженную для тРНК^{Asp} в случае образования комплекса с синтетазой 2-го структурного класса. Кроме того, сама модель не объясняет, каким образом переменный стебель тРНК взаимодействует с ферментом, так как модель построена на использовании структуры тРНК^{Phe} с короткой переменной петлей. На наш взгляд, для реализации взаимодействия переменного стебля тРНК^{Tyr} с синтетазой с одновременным вхождением акцепторного стебля в активный центр, как предлагает Bedouelle и др., необходимы некоторые конформационные изменения тРНК. Возможно, что наблюдаемая нами сильная индукция нуклеазой V₁ разрывов фосфодиэфирных связей в двух местах в тРНК^{Tyr} из *E. coli* при комплексообразовании с гомологичной синтетазой и указывает на существование необходимых для этого конформационных изменений тРНК.

Следует подчеркнуть, что наши данные об участии переменного стебля тРНК^{Tyr} во взаимодействии с тирозил-тРНК-синтетазой хорошо коррелируют с данными, полученными другими методами [20–22]. Однако взаимодействие тРНК^{Tyr} с

синтетазой со стороны переменного стебля не согласуется с концепцией о существовании в двух структурных классах синтетаз двух различных типов взаимодействия с тРНК, что вытекает из различной структуры их каталитических доменов. Кроме того, существуют подлинные биохимические данные, указывающие на то, что тирозил-тРНК-синтетаза из *E. coli* аминокислотирует тРНК по 2'-ОН-группе концевой рибозы [23]. Это свидетельствует о том, что стереохимия аминокислотирующей тРНК^{Tyr} из *E. coli* имеет типичный для 1-го структурного класса характер. Очевидно, что лишь изучение структуры комплекса тирозил-тРНК-синтетазы с тРНК^{Tyr} методом рентгеноструктурного анализа позволит решить создавшуюся дилемму. В настоящее время наши усилия направлены на получение кристаллов комплекса тРНК^{Tyr} и тирозил-тРНК-синтетазы из *T. thermophilus*, пригодных для рентгеноструктурного анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки *Thermus thermophilus* НВ-27 выращивали в среде, содержащей пептон (2%), дрожжевой

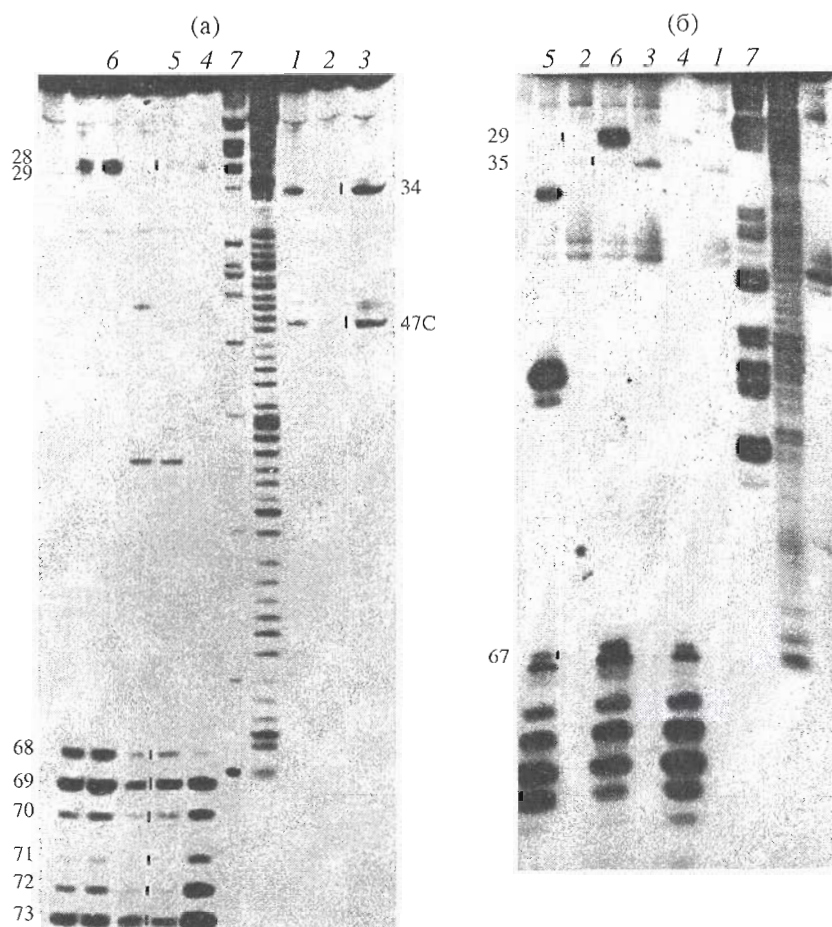


Рис. 5. Радиоавтограф ПААГ после разделения фрагментов, полученных в результате гидролиза $3'$ - ^{32}P -меченой тРНК^{Тир} из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б) нуклеазой P_1 (1), ею же в присутствии гомологичной Тир-тРНК-синтетазы (2) и гетерологичной Про-тРНК-синтетазы (3); нуклеазой V_1 (4) и ею же в присутствии гомологичной Тир-тРНК-синтетазы (5) и гетерологичной Лис-тРНК-синтетазы (6а) или Про-тРНК-синтетазы (6б). 7 – тРНК, частично гидролизованная нуклеазой T_1 .

экстракт (1 %) и NaCl (0.2 %), pH 7.0, при 74 – 76°C и интенсивной аэрации со скоростью 200 об/мин.

Суммарные препараты тРНК из *T. thermophilus* получали методом, который включает в себя фенольную экстракцию РНК из биомассы и депротенинизацию смесями фенол–хлороформ (1 : 1) и хлороформ–изоамиловый спирт (9 : 1) [24]. Для освобождения тРНК от белков и примесей нуклеотидной и полисахаридной природы использовали хроматографию на колонке с DEAE-целлюлозой (Whatman, Англия). Элюцию примесей проводили вначале 0.5 М NaCl в 0.0125 М Трис- HCl -буфере, затем 0.3 М NaCl в том же буфере. тРНК элюировали 1 М NaCl , осаждали добавлением 2.5 объема этилового спирта в присутствии 2 % ацетата натрия и оставляли на 17 – 20 ч при 4°C .

Транспортную РНК^{Тир} получали из суммарной тРНК, используя последовательно хроматографию на ВД-целлюлозе (Serva, ФРГ), 5PW и С3 (Beckman, США) и, наконец, ВЭЖХ (оборудование “Gold System” – Beckman, США).

Препарат тРНК^{Тир} из *E. coli* – производства Sigma Chemical Company (США).

Тирозил-тРНК-синтетазу из *E. coli* выделяли с использованием хроматографий на DEAE-сефарозе и гепарин-сефарозе (Pharmacia, Швеция), как в работе [25]. Тирозил-тРНК-синтетазу из *T. thermophilus* выделяли методами, описанными нами ранее [26]. 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, $[\text{S}^{32}\text{P}]\text{pCp}$ с уд. акт. 3000 Ки/ммоль (Amersham, Англия); T_1 -РНКазу (из *Aspergillus oryzae*; КФ 3.1.27.3; Sankyo, Япония); щелочную фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1; Worthington, США); Т4-поли-нуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78; Boehringer, ФРГ); тРНК-нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.2.1), любезно предоставленную R. Gieger (Институт молекулярной и клеточной биологии, Страсбург); нуклеазу P_1 (из *Penicillium citrinum*, КФ 3.1.30.1; Calbiochem, США); РНКазы V_1 (из *Cobra venom*), PhyM (из *P. polycephalum*), U_2 (из *Ustilago sphaerogena*),

РНКазу из *Bacillus cereus*, CL₃ (из *Chicken liver*) – производства Pharmacia (Швеция). Нитрозоэтилмочевина была синтезирована А.Г. Терентьевым (ИМБиг НАН Украины).

тРНК метили по 3'-концу с помощью [5'-³²P]рСр и РНК-лигазы (Boehringer, ФРГ) [27], [α -³²P]АТФ и тРНК-нуклеотидилтрансферазы [28], по 5'-концу – в реакции кинирования [29]. Для секвенирования использовали два метода: специфическую химическую деградиацию [8] и ферментативное секвенирование, основанное на гидролизе тРНК специфическими эндонуклеазами [9,10].

Ферментативное секвенирование тРНК^{Тур} из *T. thermophilus* проводили 15 мин при 55°C в 5 мкл буфера. Для РНКаз Т₁ и РнУМ использовали 0.02 М Na-цитрат (рН 5.0), 1 М EDTA, 7 М мочевины; для U₂ – 0.02 М Na-цитрат (рН 3.5), 1 М EDTA, 7 М мочевины; для РНКазы из *B. cereus* – 0.02 М Na-цитрат (рН 5.0), 1 М EDTA; для РНКазы CL₃ – 10 М Na-фосфат (рН 6.5) и 4.2 М мочевины. Для остановки реакции к пробам добавляли краску для образцов. Электрофоретическое разделение фрагментов тРНК осуществляли в 12.5 и 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. На основании анализа автордиограмм ПААГ была установлена нуклеотидная последовательность тРНК^{Тур} из *T. thermophilus* НВ-27.

Сравнительный анализ продуктов химической модификации тРНК и ее комплекса с аминоксил-тРНК-синтетазой. Меченую тРНК алкилировали нитрозоэтилмочевинной в условиях, стабилизирующих пространственную структуру молекулы, как в работах [15, 16], с небольшими изменениями. тРНК^{Тур} из *T. thermophilus* модифицировали 2 ч при 37°C, тРНК^{Тур} из *E. coli* – 2 ч при 23°C. Алкилирование тРНК^{Тур} из *T. thermophilus* и *E. coli* (0.8 мкМ) в присутствии гомологичной или гетерологичной аминоксил-тРНК-синтазы (3.2 мкМ) проводили в течение 2 ч при 37°C (для *T. thermophilus*) или 23°C (для *E. coli*) в 25 мкл 50 мМ Трис-НСl (рН 7.9), содержащего 5 мМ MgCl₂, 2.5 мМ 2-меркаптоэтанол, добавляя 2.5 мкл насыщенного спиртового раствора нитрозоэтилмочевины. Реакцию останавливали добавлением 3 мкл 3 М ацетата (рН 5.5). Аминоксил-тРНК-синтазы удаляли обработкой реакционной смеси водонасыщенным фенолом. тРНК осаждали добавлением 100 мкл этилового спирта. В контрольном эксперименте вместо этанола добавляли нитрозоэтилмочевину. Алкилирование тРНК в денатурирующих условиях проводили 2 мин при 80°C в 25 мкл 0.3 М натрий-какодилатного буфера (рН 8.0), содержащего 0.1 мМ EDTA. Полинуклеотидную цепь расщепляли по модифицированным фосфатам инкубированием в течение 5 мин в Трис-НСl-буфере (рН 9.0) при 55°C, как в работе [30].

Фрагменты тРНК анализировали гель-электрофорезом в 12.5% ПААГ в 0.05 М Трис-борат-

ном буфере (рН 8.3), содержащем 0.001 М EDTA и 8 М мочевины. Отнесение электрофоретических полос осуществляли сравнением их подвижности с подвижностью фрагментов тРНК, полученных при частичном гидролизе РНКазой Т₁. Радиоавтографы гелей сканировали с помощью микроденситометра фирмы Joyce, Loebel (Англия).

Нуклеазный гидролиз меченой термофильной или мезофильной тРНК^{Тур} (0.8 мкМ) в отсутствие или присутствии гомологичной или гетерологичной синтазы (32 мкМ) проводили в 30 мкл смеси, содержащей 25 мМ Трис-НСl (рН 7.2), 10 мМ MgCl₂, 2.5 мМ 2-меркаптоэтанол, добавляя 2.6 ед. акт./мл нуклеазы Р₁, 0.3 ед. акт./мл нуклеазы V₁ или 0.26 ед. акт./мл нуклеазы РнУМ. В последнем случае буфер был заменен на 25 мМ MOPS (рН 6.8). Инкубационную смесь выдерживали 10 мин при 37°C в случае термофильной пары и 30 мин на ледяной бане в случае мезофильной пары тРНК-синтаза. Для остановки реакции в инкубационную смесь добавляли равный объем фенола, встряхивали 4 мин, центрифугировали и отбирали водную фазу. Для осаждения тРНК добавляли 0.1 объема 3 М ацетата натрия, 10 мкг суммарной тРНК, 3 объема этилового спирта. Полученные образцы расщепленной тРНК анализировали гель-электрофорезом в 12.5 и 15% ПААГ в 0.05 М Трис-боратном буфере (рН 8.3), содержащем 1 мМ EDTA и 8 М мочевины.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке фонда Медицинского института им. Говарда Хьюза (грант № 75195-548201).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rould M.A., Perona J.J., Söll D., Steitz T.A. // Science. 1989. V. 246. P. 1135–1142.
2. Rould M.A., Perona J.J., Steitz T.A. // Nature. 1991. V. 352. P. 213–218.
3. Ruff M., Krishnaswamy S., Boeglin M., Poterszman A., Mitschler M., Podjarny A., Rees B., Thierry J.C., Moras D. // Science. 1991. V. 252. P. 1682–1689.
4. Cavarelli J., Rees B., Ruff M., Thierry J.C., Moras D. // Nature. 1993. V. 362. P. 181–184.
5. Biou V., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. // Science. 1994. V. 263. P. 1404–1410.
6. Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. // EMBO J. 1996. V. 15. P. 2834–2842.
7. Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. // Nature. 1990. V. 347. P. 203–206.
8. Peattie D.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 1760–1764.
9. Lockard R. E., Alzner-Deweerd B., Heckman J. E., MacGee J., Tabor M.W., RajBhandary U.L. // Nucleic Acids Res. 1978. V. 5. P. 37–56.
10. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. // Nucleic Acids Res. 1977. V. 4. P. 2527–2538.

11. Weißhaar M., Ahmadian R., Sprinzl M., Satoh M., Kushiro A., Tomita K. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 1902.
12. Sprinzl M., Dank N., Nock S., Schön A. // *Compilation of tRNA and tRNA Gene Sequences.* 1991. P. 252.
13. Sprinzl M., Hartmann T., Weber J., Blank J., Zeidler R. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. P. 1–72.
14. Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосом и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986.
15. Vlassov V.V., Kern D., Giege R., Ebel J.P. // *FEBS Lett.* 1981. V. 123. P. 277–281.
16. Vlassov V.V., Giege R., Kern D., Romby P., Ebel J.P. // *Eur. J. Biochem.* 1983. V. 132. P. 537–544.
17. Bedouelle H. // *Biochimie.* 1990. V. 72. P. 589–598.
18. Labouze E., Bedouelle H. // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 205. P. 729–735.
19. Bedouelle H., Winter G. // *Nature.* 1986. V. 320. P. 371–373.
20. Schoemaker H.J.P., Schimmel P.R. // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 84. P. 503–513.
21. Ackerman E.J., Joachimiak A., Klinghofer V., Sigler P.B. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 181. P. 93–102.
22. Caprara M.G., Lehnert V., Lambowitz A.M., Westhof E. // *Cell.* 1996. V. 87. P. 1135–1145.
23. Fraser T.H., Rich A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 3044–3048.
24. Brungraber E.F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1962. V. 8. P. 1–3.
25. Егорова С.П., Яремчук А.Д., Тукало М.А. // *Биополимеры и клетка.* 1998. В печати.
26. Яремчук А.Д., Тукало М.А., Егорова С.П., Коноваленко А.В., Мацука Г.Х. // *Укр. биохим. журн.* 1990. Т. 62. С. 97–99.
27. Bruce A.G., Ulenbeck O.C. // *Nucleic Acids Res.* 1978. V. 5. P. 3665–3677.
28. Silberklang M., Gillum A. M., BajBhandary U. L. // *Nucleic Acids Res.* 1977. V. 4. P. 4091–4108.
29. Vlassov V.V., Giege R., Ebel J.P. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 119. P. 51–59.
30. Vlassov V.V., Giege R., Ebel J.P. // *FEBS Lett.* 1980. V. 120. P. 12–16.

Comparative Analysis of Interaction Sites of tRNA from *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* with Cognate Aminoacyl tRNA Synthetases by the Chemical Modification and Nuclease Hydrolysis Methods

S. P. Egorova, A. D. Yaremchuk, I. A. Kriklivyi, and M. A. Tukalo[#]

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Zabolotnogo 150, Kiev, 252143 Ukraine

A nucleotide sequence of tRNA^{Tyr} from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB-27 living at 75°C was determined. It is 86 nt long and shares a 52% homology with tRNA^{Tyr} from *Escherichia coli*. A comparative analysis of the interaction sites of tRNA^{Tyr} from *T. thermophilus* and *E. coli* with the cognate aminoacyl-tRNA synthetases was accomplished by the chemical modification and nuclease hydrolysis approaches. The tRNA^{Tyr} was shown to interact with the cognate enzyme in the anticodon stem (on the 5'-side), in the anticodon, in the variable stem and loop (on the 5'-side), and in the acceptor stem (on the 3'-side). These regions are located in the variable stem of the L-form. It was demonstrated that, upon forming the complex *E. coli* tRNA^{Tyr}-cognate synthetase, endonuclease V₁ induces additional cleavages of phosphodiester bonds on the 3'-side of the anticodon stem and on the 5'-side of the T-stem. This implies that tRNA may change its conformation when it interacts with the enzyme.

Key words: aminoacyl-tRNA synthetase, tRNA, RNA-protein interaction

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: tukalo@imbg.kiev.ua.