

Вивчення елементів просторової структури тРНК^{Ser} *Thermus thermophilus* у розчині

О. П. Коваленко, І. А. Крикливий, М. А. Тукало

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Методами хімічної модифікації вивчено реакційну здатність залишків фосфорної кислоти та азотистих основ, що входять до складу тРНК^{Ser} з *T. thermophilus*. Отримані результати свідчать про надзвичайну близькість просторової структури тРНК^{Ser} у розчині до такої в кристалі комплексу тРНК^{Ser} *T. thermophilus* з серил-тРНК синтетазою.*

Вступ. Трансляція нуклеотидної послідовності генів в амінокислотну послідовність білків є фундаментальним процесом у живих системах. Молекули тРНК відіграють у ньому центральну роль як адаптори між кодоном на мРНК та амінокислотами. Розуміння механізмів впізнавання тРНК, наслідком якого є специфічне аміноацилювання тРНК аміноацил-тРНК синтетазою, досі залишається однією з невирішених проблем молекулярної біології, незважаючи на велику кількість робіт, присвячених цій темі. Результати рентгеноструктурного аналізу та біохімічних досліджень виявили значну подібність просторової будови молекул тРНК, які мають різну амінокислотну специфічність, що додатково ускладнює процес вибору аміноацил-тРНК синтетазою гомологічної тРНК серед інших молекул тРНК. Протягом останніх двох десятиліть за допомогою генетичних, біохімічних та біофізичних методів було показано, що для тРНК будь-якої амінокислотної специфічності характерним є певний набір нуклеотидних залишків, критичних для впізнавання цієї тРНК гомологічною аміноацил-тРНК синтетазою. Але, згідно з сучасною концепцією, важливу роль відіграють не лише специфічні до послідовності контакти тРНК з ферментом, але й просторові особливості взаємодіючих макромолекул [1, 2]. Розвиток цієї ідеї викликав посилення інтересу до ролі структурних особливостей тРНК у процесі специфічного аміноацилювання.

На особливу увагу заслуговують тРНК II класу, до яких відносяться тРНК^{Ser}, тРНК^{Leu} та тРНК^{Tyr} прокариот, хлоропластів та мітохондрій нижчих сукаріот, а також тРНК^{Ser} та тРНК^{Leu} (цитоплазматичні) еукаріот та архебактерій, варіабельна гілка яких утворена не менш як десятьма нуклеотидними залишками, що формують варіабельне стебло та петлю. Фактично вони містять додатковий структурний домен, якщо порівнювати з тРНК I класу, що надає їм додаткові переваги на етапі специфічного аміноацилювання. Але, з іншого боку, тРНК з довгою варіабельною гілкою повинні мати конфігурацію, максимально наближену до L-форми, характерної для молекул тРНК, з огляду на неспецифічні взаємодії тРНК з білковими факторами та рибосомою під час трансляції.

Прямим методом вивчення просторової структури тРНК є рентгеноструктурний аналіз. За допомогою цього методу було вивчено будову декількох елонгаторних тРНК I класу: тРНК^{Pro} [3], тРНК^{Asp} дріжджів [4] у вільному стані, а також тРНК^{Asp} дріжджів [5], тРНК^{Glu} *Escherichia coli* [6] та тРНК^{Cys} [7] у складі комплексу з гомологічною аміноацил-тРНК синтетазою. Для тРНК II класу було створено теоретичні моделі просторової будови, які базувалися як на результатах рентгеноструктурних досліджень тРНК з короткою варіабельною петлею [8], так і на біохімічних даних, отриманих для тРНК II класу у розчині [9]. З іншого боку, за допомогою генетичних методів було встановлено, що тРНК^{Ser} і тРНК^{Leu} впізнаються гомологічними аміноацил-тРНК синтетазами

особливим антикодон-незалежним шляхом [10—12], що нехарактерно для тРНК I класу [13, 14] (за виключенням тРНК^{Ala} [15]). Основну роль у реалізації такого шляху відіграють елементи третинної структури тРНК [10, 16, 17]. Незважаючи на підвищений інтерес вчених до процесів специфічного впізнавання та дискримінації за участю тРНК II класу, на сьогоднішній день існує лише невелика кількість робіт, присвячених докладному вивченню особливостей просторової будови цих макромолекул [9, 12, 18—20].

Кілька років тому було отримано та вивчено за допомогою рентгеноструктурного аналізу кристали комплексу тРНК^{Ser} (GGA) *T. thermophilus* із серил-тРНК синтетазою [1, 21]. Було з'ясовано, що в корі молекули тРНК^{Ser} відбуваються дві незвичайні триплетні взаємодії між нуклеотидами в положеннях 9, 13, 22 та 15, 48, 20а, яких не спостерігали в тРНК I класу. Особливу роль відіграє і додатковий нуклеотидний залишок G20b у D-петлі, який знаходиться в стежінгу з першою парою нуклеотидів варіабельного стебла і, таким чином, визначає орієнтацію останнього.

Метою нашої роботи було встановити, чи відповідає структура тРНК^{Ser} *T. thermophilus* у розчині такій у кристалічному стані, адже відомо, що умови кристалізації не є фізіологічними і можуть призводити до руйнації зв'язків, що підтримують просторову структуру тРНК [22]. З іншого боку, взаємодія з ферментом викликає конформаційні зміни в тРНК [5], іноді досить суттєві [23].

При вивченні елементів просторової структури тРНК^{Ser} *T. thermophilus* у розчині застосовували методи хімічної модифікації. Модифікацію азотистих основ проводили за допомогою диметилсульфату та діетилпірокарбонату, фосфатних залишків — етилнітрососечовини, які широко та ефективно застосовуються для вивчення структури РНК. Експерименти проводили окремо для двох ізоакцепторних тРНК^{Ser} *T. thermophilus*: тРНК^{Ser} (GCU) та тРНК^{Ser} (GGA), нуклеотидні послідовності яких ідентичні на ділянках акцепторного стебла, D- і T-гілок [24]. Отримані результати свідчать про надзвичайно близьку просторову структуру цих тРНК, тому ми наводимо лише дані з вивчення тРНК^{Ser} (GCU).

Матеріали і методи. Індивідуальну тРНК^{Ser} *T. thermophilus* виділяли за схемою, викладеною в роботі [24].

У роботі було використано диметилсульфат, гідазин («Fluka», Швейцарія); діетилпірокарбонат («Calbiochem», США); боргідрид натрію («Serva», Німеччина); етилнітрососечовину («Sigma», США), лужну фосфатазу *E. coli* (КФ 3.1.3.1), фосфодіес-

теразу отрути змії (КФ 3.1.4.1; «Sigma»); полінуклеотидкіназу (КФ 2.7.1.78), виділену з *E. coli* інфікованої фагом T4 («BioLab», США); тРНК-нуклеотидилтрансферазу дріжджів, яку було люб'язно надано З. М. Петрушенко (ІМБіГ НАН України); T1-РНКаза (КФ 3.1.27.3; «Sankyo», Японія), нуклеазу Phу M з *P. polycephalum* («Pharmacia», Швеція); [α -³²P]АТР, [γ -³²P]АТР з пит. акт. 2000—3000 Ки/ммоль («Amersham», Англія).

тРНК^{Ser}, що містила ³²P на 3'- або 5'-кінці, отримували, як це описано в роботах [25] і [26] відповідно.

Фосфатні залишки в тРНК^{Ser} алкілювали, як у роботі [27], з невеликими модифікаціями. Інкубацію проводили в умовах, стабілізуючих просторову структуру тРНК (0,3 М какодилат натрію, рН 8,0, 0,1 М NaCl, 0,02 М MgCl₂, 2 мМ EDTA при температурі 65 °С протягом 5 хв), та в умовах денатурації (0,3 М какодилат натрію, рН 8,0, 2 мМ EDTA, 80 °С, 2 хв). Етилнітрососечовину додавали до реакційної суміші у вигляді насиченого розчину в етанолі: 5 мкл розчину реагента до 20 мкл буферного розчину, який містив 0,4 мкг тРНК, міченої в одному з кінців. Кінцева концентрація реагента складала 150 мМ. У контрольних експериментах замість розчину реагента додавали відповідний об'єм чистого етанолу.

Реакцію алкілювання зупиняли додаванням 10 мкг глікогену, 3 мкл 3 М ацетату натрію та осаджували тРНК етанолом. Для розщеплення полінуклеотидного ланцюга за модифікованими фосфатами алкілювану тРНК інкубували в 10 мкл 0,1 М трис-НСІ буфера, рН 9,0 (55 °С) протягом 5 хв. Реакцію зупиняли, як і при алкілюванні, але без додавання глікогену. Отримані зразки гідролізованої тРНК розділяли в поліакриламідному гелі (ПААГ) за допомогою високовольтного електрофорезу. Електрофоретичні смуги диференціювали, порівнюючи їхню рухливість з рухливістю фрагментів відповідної тРНК, отриманих шляхом часткового гідролізу рибонуклеазою T₁. Радіоавтографи гелів сканували за допомогою денситометра «Ultra-Scan XL» фірми «LKB» (Швеція). Результати розрахунків денситограм представлені як значення R; відношення інтенсивностей відповідних смуг, отриманих після розділення фрагментів тРНК, алкілюваної за нативних умов та умов денатурації. Діапазон зміни величини R від 0 (фосфат немодифікований) до 1 (фосфат, модифікований повністю). Відмінності в значеннях R у різних експериментах не перевищували 20 %.

Алкілювання атома N7 гуанозинів та атома N3 цитидинів диметилсульфатом та атома N7 аденозинів діетилпірокарбонатом здійснювали за методи-

кою, викладеною в роботі [28], з невеликими змінами. В усіх випадках порівнювали реакційну здатність азотистих основ за трьох умов: нативних (65 °С, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂; час інкубації для модифікації залишків гуанозину — 1 хв 15 с, цитидину — 1 хв 45 с, аденозину — 3 хв), напівденатурації (65 °С, 1 мМ ЕДТА, час інкубації такий, як і для нативних умов) та денатурації (90 °С, 1 мМ ЕДТА, час інкубації для модифікації залишків гуанозину — 45 с, цитидину — 55 с, аденозину — 2 хв 30 с). Модифікації здійснювали в 100 мкл 50 мМ какодилату натрію, рН 7,0, який містив 0,1 мкг тРНК, міченої в одному з кінців, та 10 мкг сумарної тРНК *T. thermophilus*. Модифіковані залишки гуанозину обробляли потім 0,2 М розчином боргідриду натрію в 1 М трис-НСl, рН 8,2, при 0 °С, залишки цитидину — 50 %-м розчином гідразину при 0 °С. Полінуклеотидний ланцюг розщеплювали за модифікованими залишками в 1 М анілін-ацетатному буфері, рН 4,5, при 60 °С, як у роботі [29]. Отримані зразки гідролізованої тРНК аналізували за допомогою високовольтного електрофорезу в ПААГ. Паралельно проводили контрольні експерименти в нативних умовах при відсутності реагента, але з виконанням усіх наступних етапів.

Результати та обговорення. Модифікацію залишків цитидину в тРНК^{Ser} *T. thermophilus* проводили за допомогою диметилсульфату, який метилює N3 атом цитидинів. На рис. 1 представлений радіоавтограф з результатами експерименту. Реакційну здатність цитидинових основ наведено в таблиці. Декілька цитидинових залишків мають високий рівень модифікації в умовах напівденатурації, а саме: C50, C56, а також ті, що входять до складу акцепторного стебла. Завжди доступними для дії реагента в нативних умовах є залишки в положеннях 20, 32 та 35. За допомогою використаного методу практично неможливо вивчити реакційну здатність залишку C46, розташованого у варіабельному стеблі тРНК^{Ser}. Інтерпретація отриманих результатів значною мірою ускладнена через порушення рухливості відповідного полінуклеотидного фрагмента, що, на нашу думку, пов'язано зі значною жорсткістю структури варіабельного стебла тРНК^{Ser}.

На рис. 1 та в таблиці представлено також результати модифікації атома N7 гуанозинових залишків. В умовах денатурації та напівденатурації всі залишки гуанозину цілковито реакційно здатні. За нативних умов захищеними від модифікації є гуанозини в положеннях 9, 13, 23, 26, 27, 47d, 51-53 та 57. Залишки гуанозину в положеннях 1, 2, 4, 6, 7, 10, 15, 19, 20b, 24, 34, 39, 40, 42, 45,

47c, 47e, 47m, 47n, 47p, 49, 64, 73, а також Gm18 мають високий рівень модифікації і за нативних умов.

У результаті проведених експериментів було встановлено, що високий рівень модифікації діетилпірокарбонатом атома N7 є характерним для залишків аденозину, розташованих в одноланцюгових ділянках: A21, ¹A37, A38, та A47g-A47j. Ті залишки, що входять до складу стеблових структур, а також A14 та A59 мають низьку реакційну здатність у нативних умовах.

Реакційну здатність залишків фосфорної кислоти в тРНК^{Ser} *T. thermophilus* визначали за допомогою етилнітрососечовини, яка етилює атоми кисню в складі фосфатів. Результати експерименту наведено на рис. 1. Після модифікації використовували осадження етанолом, що призводить до неповного виділення коротких фрагментів полінуклеотидів та не дозволяє отримати об'єктивної інформації щодо рівня модифікацій фосфатів, розташованих близько до кінців тРНК (P1—P5, P70—P76) [27]. Також у тРНК^{Ser} *T. thermophilus* неможливо дослідити рівень модифікації 5'-фосфату нуклеотиду G19, тому що присутність у положенні 18 залишка з 2'-O-метилрибозою значно ускладнює розрив фосфодієфірного зв'язку між нуклеотидами 18 та 19.

Розташування залишків фосфорної кислоти та азотистих основ, що мають низький рівень модифікації в нативних умовах, у структурі тРНК^{Ser} вказано на рис. 2.

Аналіз отриманих даних дозволяє зробити висновки про те, що утворення вторинної структури тРНК^{Ser} з *T. thermophilus* відбувається за загальною схемою у вигляді листка конюшини. Про це свідчить низький рівень модифікації в нативних умовах атомів N3 цитидинів у положеннях 11, 12, 25, 28 (D-стебло), 30, 31 (антикодонове стебло), 46, 47a, 47b, 47k, 47l, 47q (варіабельне стебло), 50, 61—63, 65 (T-стебло) та 66, 67, 69, 71, 72 (акцепторне стебло). Існуванням двоспіральних ділянок та виникненням стекінг-взаємодій можна пояснити захист від модифікації атома N7 аденозинів у положеннях 5, 29, 47, а також низьку реакційну здатність атомів N7 гуанозинів у положеннях 23 та 27. Але диметилсульфат є меншим за розмірами реагент, ніж діетилпірокарбонат, тому реакція модифікації диметилсульфатом чутливіша до існування невеликих відхилень у регулярності спіральних районів РНК, а також до оточення залишку. Цим пояснюється високий рівень модифікації в нативних умовах решти гуанозинів, розташованих у стеблових ділянках, за виключенням G51—G53 (див. нижче) в T-стеблі.

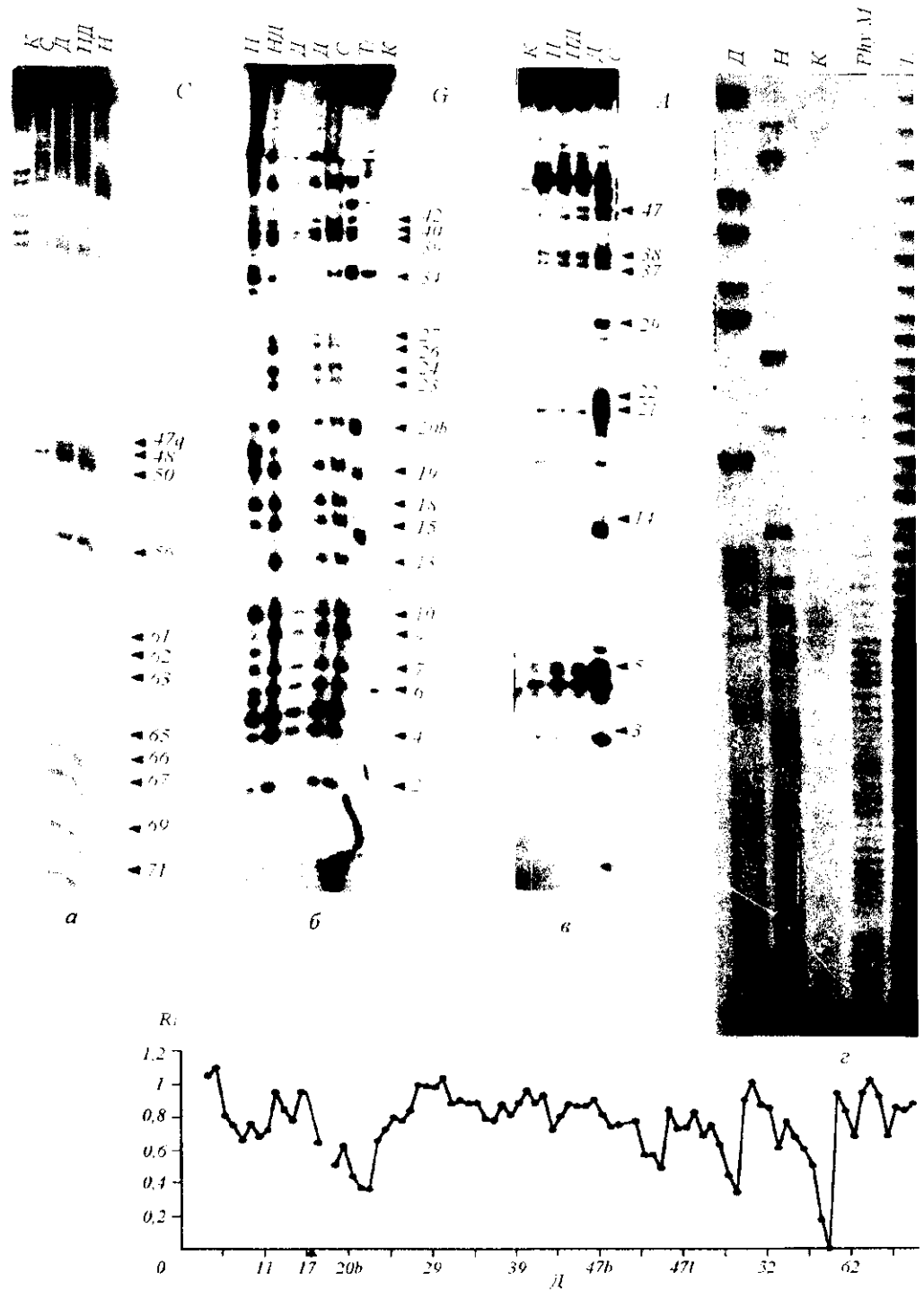


Рис. 1. Авторадіограми ПААГ, в яких було розділено фрагменти, отримані в результаті модифікації залишків цитидину (б) диметилсульфатом, аденозину (в) — діетилендікарбонатом, залишків фосфорної кислоти (д) — ет в умовах нативних (Н), напівденатурації (НД), денатурації (Д) та умовах, в яких визначали нуклеотидну послідовність *thermophilus* [24] (С); К — контрольна інкубація при відсутності реагента; Т₁ та R_h M — tРНК^{Ser}, час Т₁-РНКазами Т1 та R_h M відповідно; δ — крива розрахунку денситограм; R_i — відносна реакційна здатність кислоти; P_i — номер фосфату в нуклеотидній послідовності tРНК^{Ser} *T. thermophilus*

Результати модифікації тРНК^{Ser} диметилсульфатом та діетилпірокарбонатом

Положення	Основа	Ступінь модифікації	Положення	Основи	Ступінь модифікації
2	G	++	47	A	--
3	A	+	47a	C	--
4	G	+	47b	C	--
5	A	-+	47c	G	+
6	G	+	47d	G	-+
7	G	+	47e	G	+
9	G	-+	47g	A	+
10	G	+	47h	A	+
11	C	--	47i	A	+
12	C	--	47j	A	+
13	G	-+	47k	C	-+
14	A	-+	47l	C	-+
15	G	±+	47m	G	+
18	Gm	+	47n	G	+
19	G	+	47p	G	+
20	C	+	47q	C	-+
20b	G	+	48	C	-+
21	A	+	49	G	+
22	A	-+	50	C	-+
23	G	-+	51	G	-+
24	G	-+	52	G	-+
25	C	--	53	G	-+
26	G	-+	56	C	-+
27	G	-+	57	G	-+
28	C	--	59	A	-+
29	A	-+	61	C	-+
30	C	--	62	C	--
31	C	--	63	C	--
32	C	+	64	G	±+
34	G	+	65	C	-+
35	C	+	66	C	-+
37	G ^o A	+	67	C	-+
38	A	+	69	C	-+
39	G	+	71	C	-+
40	G	+	72	C	-+
42	G	+	73	G	+
45	G	++	74	C	+
46	C	НВ	75	C	+

П р и м і т к а: ← → — залишок набуває реакційної здатності лише в умовах денатурації (іони Mg²⁺ відсутні, 1 мМ ЕДТА, 90 °С); ← + → — залишок реакційноздатний в умовах напівденатурації (іони Mg²⁺ відсутні, 1 мМ ЕДТА, 65 °С). «+++» — залишок активний і в нативних умовах (у присутності 10 мМ MgCl₂, 65 °С); НВ — реакційну здатність залишку не визначено.

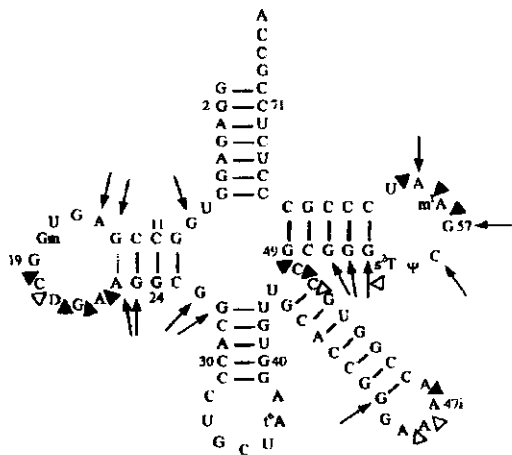


Рис. 2. Структура тРНК^{Ser} *T. thermophilus* у вигляді листка конюшини. Вказано залишки фосфорної кислоти, які мають низьку (чорні трикутники) або помітно знижену (світлі трикутники) реакційну здатність в умовах, що стабілізують просторову структуру тРНК. Також позначено нуклеотидні залишки, азотисті основи яких мають низький рівень модифікації специфічними хімічними реагентами в нативних умовах, за виключенням залишків цитидину та аденину, розташованих у двоспіральних ділянках

Необхідно звернути увагу на підвищену лабільність акцепторного стебла, про що свідчить висока реакційна здатність у нативних умовах залишків аденозину та гуанозину, що входять до його складу, та залишків цитидину — в умовах напівденатурації. Це явище може бути наслідком комбінації двох факторів: досить високої температури інкубації (65 °C) та розташування в положенні 73 залишку гуанозину [30].

Усі нуклеотидні залишки антикодонової петлі мають високу реакційну здатність та не беруть участі у підтриманні просторової структури тРНК^{Ser} *T. thermophilus*.

Конформацію Т-петлі в тРНК зумовлює наявність трьох консервативних залишків: T54, A58 та C61 [31], які присутні також і в тРНК^{Ser} *T. thermophilus*. Тому низька реакційна здатність 5'-фосфату нуклеотиду в положенні 60 може бути наслідком утворення водневого зв'язку з атомом N-4 основи C61 та 2'-гідроксильною групою рибози нуклеотиду 58 [32]. Через те, що в тРНК^{Ser} *T. thermophilus* в положеннях 54 та 58 знаходяться мінорні нуклеотиди s²T та m¹A, отримати інформацію про існування у розчині оберненої пари

Хугстіна T54—A58 за допомогою використаних методів неможливо. Спираючись на літературні дані, низьку реакційну здатність залишку G57 можна пояснити утворенням водневих зв'язків з рибозами нуклеозидів 18, 19 та 55, а знижений рівень модифікації фосфату нуклеотиду 58 — взаємодією з залишком Ψ55, як це спостерігали в кристалі тРНК^{Phe} дріжджів [3]. Найімовірніше, Т-петля тРНК^{Ser} *T. thermophilus* має таку ж просторову структуру, як і в інших тРНК, які містять T54, A58 та C61. У роботі [32] було показано, що за таких умов структура Т-петлі не залежить від укладки решти молекули.

В обох тРНК^{Ser} *T. thermophilus* інваріантні залишки гуанозинів у положеннях 18 та 19 мають високий рівень модифікації. Але відсутність за нативних умов реакційної здатності залишку C56 вказує на існування третинної взаємодії G18 з C56 з утворенням пари уотсон-кріківського типу, як це відомо з кристалографічних даних для тРНК I класу [3, 4] та тРНК^{Ser} (GGA) *T. thermophilus* [1]. Тобто, як і у кристалі, в розчині відбувається взаємодія D- і Т-петель тРНК через утворення водневих зв'язків.

Однією з особливостей тРНК II класу є існування неканонічної пурин-пуринової пари 13—22 в D-стеблі. У випадку тРНК^{Ser} *T. thermophilus* ця пара входить до складу триплету (G13—A22)-G9 з утворенням водневих зв'язків: N3(G13)...N6(A22); N2(G13)...N7(A22); N2(G13)...O6(G9); N1(G13)...N7(G9), а також між N6(A22) та рибозою нуклеотиду G13; N1, N2(G9) та фосфатною групою нуклеотиду A22 [1]. Відсутність реакційної здатності в нативних умовах атомів N7 основ G9, G13 та A22, а також низький рівень модифікації фосфату нуклеотиду 22 свідчать на користь існування такої взаємодії і в розчині. Сильна стекінг-взаємодія пари G13-A22 з іншими парами нуклеотидів у D-стеблі, очевидно, ускладнює модифікацію положення N7 залишку G13.

Участю у взаємодіях, що підтримують просторову структуру тРНК^{Ser}, пояснюється і відсутність у нативних умовах реакційної здатності залишку A14, розташованого в D-петлі. Як відомо, в тРНК^{Phe} дріжджів A14 утворює водневі зв'язки з U8 за участю аміногрупи та положення N7 аденозину [3]. Таку ж взаємодію спостерігали і в кристалі тРНК^{Ser} *T. thermophilus* [1].

В одній площині з парою 8—14 в тРНК^{Phe} дріжджів лежить основа 21, утворюючи триплет [3]. Біохімічні дослідження виявили, що в тРНК^{Phe} дріжджів та тРНК^{Asp} *E. coli* нуклеотид у положенні 21 поводиться себе по-різному щодо дії диметилсульфату. Це пов'язано з різною довжиною варіа-

бельних петель цих тРНК I класу та положенням основи 46 [28]. У кристалі тРНК₂^{Ser} *T. thermophilus* також існує триплетна взаємодія [14—8]—21, але її особливістю є те, що площина основи A21 знаходиться під кутом $\approx 45^\circ$ до площини пари 8—14. При цьому атом N7 стає доступним для метилювання діетилпірокарбонатом, про що свідчить висока реакційна здатність залишку A21 у тРНК^{Ser} *T. thermophilus*. У тРНК^{Ser} дріжджів A21 має низьку реакційну здатність, що вказує на різну конфігурацію корової взаємодії [8—14]—21 у тРНК^{Ser} прокариотичного та еукариотичного типів. Це пов'язане, напевно, з різною структурою D-петель серинових тРНК еукариотичного та прокариотичного типу ($\alpha = 1$, $\beta = 3$ у тРНК^{Ser} *T. thermophilus*; $\alpha = 2$, $\beta = 2$ в тРНК^{Ser} дріжджів).

Фосфати остова D-петлі тРНК^{Ser} *T. thermophilus* на ділянці від P20 до P21 у нативних умовах мають реакційну здатність, знижену переважно на 50 % порівняно з їхньою реакційною здатністю в умовах денатурації (рис. 1, д). Таке явище легко пояснити, якщо взяти до уваги незвичайну «зигзагоподібну» конфігурацію остова β -ділянки D-петлі та її розташування поблизу варіабельного стебла, як це спостерігали в кристалі комплексу тРНК^{Ser}—серил-тРНК синтаза *T. thermophilus*. У такому випадку виникають стеричні перешкоди для модифікації відповідних фосфатних залишків.

У тРНК I класу нуклеотиди в положеннях 26 та 44 утворюють пурин-пуринову пару, але для тРНК з довгою варіабельною гілкою характерна пурин-піримідинова пара. У випадку тРНК₁^{Ser} у положенні 26 знаходиться залишок гуанозину, в тРНК₂^{Ser} — аденозину. В обох ізоакцепторних тРНК^{Ser} у положенні 44 знаходиться залишок уридину. На жаль, довести існування пари 26—44 у цьому разі неможливо, оскільки використані методи не дозволяють дослідити участь залишків уридину в утворенні нуклеотидних пар. Але відсутність реакційної здатності пурину в положенні 26 в обох тРНК^{Ser} можна інтерпретувати як наслідок існування неперервної подвійної спіралі, утвореної D- та антикодоновими гілками при виникненні L-форми молекули. В такому випадку основи 26 та 44 утворюють воббл-пару G-U в тРНК₁^{Ser} за допомогою двох водневих зв'язків, як це запропоновано для тРНК^{Ser} дріжджів [9]. Стекінг-взаємодії, які виникають між парою 26—44 та нуклеотидами D-і антикодонового стебла, заважають модифікації атома N7 пуринових залишків у положенні 26 тРНК^{Ser} *T. thermophilus*.

Прямі методи хімічної модифікації не дозволяють вивчити участь дигідроуридину 20а в корових взаємодіях, тому ми не можемо довести існування

в структурі тРНК^{Ser} у розчині саме триплету [15—48]—20а. Але відсутність реакційної здатності атома N3 залишку C48 свідчить, що пара G15-C48 існує. Як відомо з літературних даних, залишок пурину в положенні 15 у тРНК^{Phe} та тРНК^{Asp} дріжджів знаходиться у стекінгу з парою 8—14 [3, 4], тому в розчині він має низький рівень модифікації в нативних умовах [22]. Відсутність реакційної здатності спостерігали також для G15 в тРНК^{Leu} молочної залози корів [18] та тРНК^{Ser} дріжджів [9], які належать до II класу. В тРНК^{Ser} *T. thermophilus* залишок G15 доступний для дії реагента в нативних умовах, хоча рівень його модифікації дещо знижений порівняно з таким в умовах напівденатурації та денатурації, що свідчить про недосконалість стекінг-взаємодії між G15 та парою 8—14. Можливо, порушення копланарності основ у триплеті [8—14]—21 створює умови, за яких положення N7 нуклеотиду G15 стає доступним для модифікації диметилсульфатом.

Для тРНК з довгою варіабельною гілкою характерною є низька реакційна здатність пуринової основи в положенні 59 T-петлі [9, 18]. Низький рівень модифікації для G59 спостерігали і при вивченні тРНК^{Ser} *T. thermophilus*, що можна пояснити виникненням стекінг-взаємодії між основою 59 та парою нуклеотидів 15—48. Створюючи комп'ютерну модель просторової структури тРНК^{Ser} дріжджів, автори роботи [9] звернули увагу на те, що така взаємодія можлива в тРНК II класу, тому що в положенні 59 цих тРНК завжди знаходиться залишок пурину.

Зниження реакційної здатності фосфатних залишків варіабельної петлі (A47h- A47j) та азотистих основ G51-G53 у T-петлі відбувається, скоріше за все, внаслідок взаємодії з іонами Mg²⁺, як це було запропоновано для тРНК, що вивчали раніше [9].

Таким чином, нами встановлено, що в розчині існують взаємодії G15-C48, U8-A14, G9-A22-G13. На жаль, використані методи не дозволяють дослідити участь залишків D20а та A21 у взаємодіях, що підтримують просторову структуру тРНК^{Ser} *T. thermophilus*. У розчині залишок G20b завжди мав високу реакційну здатність, що не обов'язково свідчить про відсутність стекінгу між ним та основами варіабельного стебла. Найімовірніше, існуюча стекінг-взаємодія недосконала або не досить сильна, щоб створювати перешкоди для модифікації положення N7 диметилсульфатом, молекула якого має порівняно невеликий розмір [33].

Узагальнюючи отримані дані, можна зробити висновок, що просторова укладка тРНК^{Ser} *T. thermophilus* у розчині відбувається за допомогою та-

ких взаємодій: в корі молекули — G15-C48, U8-A14, G9-A22-G13, G9 з фосфатною групою нуклеотиду A22, пари нуклеотидів 26—44 та стекінг взаємодії залишку A59 з парюю 15—48. У Т-петлі виникають водневі зв'язки між фосфатами нуклеотиду U60 і N4-групою C61 та рибозою нуклеотиду 58, між Ψ55 та фосфатом нуклеотиду 58. Третинна структура стабілізована також взаємодією нуклеотидів варіабельної петлі (P47h-P47j) та Т-стебля (G51-G53) з іонами Mg²⁺. Таким чином, конфігурація тРНК^{Ser} *T. thermophilus* у розчині дуже близька або навіть ідентична такій у кристалі. Отримані дані свідчать також про те, що утворення комплексу з серил-тРНК синтетазою відбувається без глобальних змін у просторовій організації тРНК-субстрату.

Робота частково фінансувалася медінститутом Говарда Г'юза (США), грант № 75195—548201.

О. П. Коваленко, І. А. Крикливий, М. А. Тукало

Изучение элементов пространственной структуры тРНК^{Ser} *Thermus thermophilus* в растворе

Резюме

Изучена реакционная способность остатков фосфорной кислоты и азотистых оснований, входящих в состав тРНК^{Ser} *T. thermophilus*, с помощью методов химической модификации. Для модификации фосфатов использовали этилнитрозомочевину, остатков гуанозина и цитидина — диметилсульфат, аденозина — диэтилпирокрбонат. Установлено, что для структуры тРНК^{Ser} в растворе характерны те же третичные взаимодействия, что и для структуры тРНК^{Ser} *T. thermophilus* в кристалле комплекса с серил-тРНК синтетазой.

О. P. Kovalenko, I. A. Kriklyviy, M. A. Tukoalo

Study of tertiary structure elements of tRNA^{Ser} from *Thermus thermophilus* in solution

Summary

Reactivity of phosphates and bases in tRNA^{Ser} *T. thermophilus* has been studied by chemical modification methods. Ethylnitrosourea has been used to modify phosphate groups, guanosines and cytidines have been modified by dimethylsulphate, adenosines — by diethylpyrocarbonate. The same tertiary interactions exist in the solution structure of tRNA^{Ser} *T. thermophilus* as in the crystal one.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Biou V., Yaremchuk A., Tukoalo M., Cusack S. The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with тРНК^{Ser} // Science.—1994.—263.—P. 1404—1410.
2. Giege R., Florentz C., Garcia A., Grosjean H., Perret V., Puglisi J., Theobald-Dietrich A., Ebel J.-P. Exploring the aminoacylation function of transfer RNA by macromolecule engineering approaches. Involvement of conformational features in the charging process of yeast tRNA^{Asp} // Biochimie.—1990.—72.—P. 453—461.
3. Holbrook S. R., Sussman J. L., Warrant R. W., Kim S. H. Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA II. Structural feature and functional implications // J. Mol. Biol.—1978.—123, N 4.—P. 631—660.
4. Westhof E., Dumas D., Moras D. Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA // J. Mol. Biol.—1985.—184, N 1.—P. 119—145.
5. Ruff M., Krishnaswamy S., Boeglin M., Poterszman A., Mitschler A., Podjarny A., Rees B., Thierry J. C., Moras D. Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Asp} // Science.—1991.—252.—P. 1682—1689.
6. Rould M. A., Perona J. J., Soll D., Steitz T. A. Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Glu} and ATP at 2.8 Å resolution // Science.—1989.—246.—P. 1135—1142.
7. Nissen P., Thirup S., Kjeldgaard M., Nyborg J. The crystal structure of cys-tRNA^{Cys}-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA // Structure.—1999.—7, N 2.—P. 143—156.
8. Brennan T., Sundaralingam M. Structure of transfer RNA molecules containing the long variable loop // Nucl. Acids Res.—1976.—3, N 11.—P. 3235—3251.
9. Dock-Bregeon A. C., Westhof E., Giege R., Moras D. Solution structure of a tRNA with large variable region: yeast tRNA^{Ser} // J. Mol. Biol.—1989.—206.—P. 707—722.
10. Asahara H., Himeno H., Tamura K., Nameki N., Hasegawa T., Shimizu M. *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} by its characteristic tertiary structure // J. Mol. Biol.—1994.—236.—P. 738—748.
11. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Гудзера О. И., Рожко О. Т., Мацука Г. Х. Определение участков взаимодействия тРНК^{Leu} молочной железы коров с гомологичной аминокислот-тРНК синтетазой методом химических модификаций // Биорг. химия.—1990.—16.—С. 1647—1652.
12. Dietrich A., Romby P., Marechal-Drouard L. P., Guillemaut R., Giege R. Solution conformation of several free tRNA^{Leu} species from bean, yeast and *Escherichia coli* and interaction of these tRNAs with bean cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase. A phosphate alkylation study with ethylnitrosourea // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 2589—2597.
13. McClain W. H. Rules that govern tRNA identity in protein synthesis // J. Mol. Biol.—1993.—234, N 2.—P. 257—280.
14. Normanly J., Abelson J. tRNA identity // Annu. Rev. Biochem.—1989.—58.—P. 1029—1049.
15. Tamura K., Asahara H., Himeno H., Hasegawa T., Shimizu M. Identity elements of *E. coli* tRNA^{Ala} // J. Mol. Recog.—1991.—4.—P. 129—132.
16. Asahara H., Himeno H., Tamura K., Hasegawa T., Watanabe K., Shimizu M. Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA^{Leu} and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser} and tRNA^{Tyr} // J. Mol. Biol.—1993.—231.—P. 219—229.
17. Asahara H., Nameki N., Hasegawa T. In vitro selection of tRNAs aminoacylated by *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase // J. Mol. Biol.—1998.—283, N 3.—P. 605—618.
18. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Изучение пространственной структуры тРНК^{Leu} (IAG) из молочной железы коров методом химических модификаций // Биорг. химия.—1988.—14, № 1.—С. 31—36.
19. Watanabe Y., Tsurui H., Ueda T., Furushima R., Takamiya S., Kita K., Nishikawa K., Watanabe K. Primary and higher order structures of nematode (*Ascaris suum*) mitochondrial tRNAs lacking either the T or D stem // J. Biol. Chem.—1994.—269, N 36.—P. 22902—22906.
20. Watanabe Y., Kawai G., Yokogawa T. T., Hayashi N., Kumazawa Y., Ueda T., Nishikawa K., Hirao I., Miura K., Watanabe K. Higher-order structure of bovine mitochondrial

- tRNA(Ser UGA): chemical modification and computer modeling // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 24.—P. 5378—5384.
21. Cusack S., Yaremchuk A., Tuskalo M. The crystal structure of the ternary complex of *Thermus thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA^{Ser} and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site // The EMBO J.—1996.—15, N 11.—P. 2834—2842.
 22. Romby P., Giege R., Houssier C. Anticodon-anticodon interactions in solution. Studies of the self-association of yeast or *Escherichia coli* tRNA^{Asp} and of their interactions with *Escherichia coli* tRNA^{Val} // J. Mol. Biol.—1985.—184, N 1.—P. 107—118.
 23. Nureki O., Niimi J., Muto Y., Kanno H., Kohno T., Muramatsu T., Kawai G., Miyazawa T., Giege R., Florentz C., Yokoyama S. Conformational change of tRNA upon interaction of the identity — determinant set with aminoacyl-tRNA synthetase // The translational apparatus.—New York; London: Plenum press, 1993.—P. 59—78.
 24. Петрушенко З. М., Коваленко О. П., Мальченко Н. Н., Крикливий И. А., Яремчук А. Д., Тукало М. А. Первичная структура тРНК^{Ser} из *Thermus thermophilus* // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 3.—С. 202—208.
 25. Silberklang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L. The use of nuclease P1 in sequence analysis of end group labelled RNA // Nucl. Acids Res.—1977.—4, N 12.—P. 4091—4108.
 26. Vlassov V. V., Giege R., Ebel J. P. Tertiary structure of tRNAs in solution monitored by phosphodiester modification with ethylnitrosourea // Eur. J. Biochem.—1981.—119, N 1.—P. 51—59.
 27. Vlassov V. V., Giege R., Ebel J.-P. The tertiary structure of yeast tRNA^{Phe} in solution. The tertiary structure of yeast tRNA^{Phe} in solution // FEBS Lett.—1980.—120, N 1.—P. 12—16.
 28. Romby P., Moras D., Dumas P., Ebel J. P., Giege R. Comparison of the tertiary structure of yeast tRNA(Asp) and tRNA(Phe) in solution. Chemical modification study of the bases // J. Mol. Biol.—1987.—195, N 1.—P. 193—204.
 29. Peattie D. A. Direct chemical method for sequencing RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 4.—P. 1760—1764.
 30. Metzger A. U., Heckl M., Willbold D., Breitschopf K., RajBhandary U. L., Rosch P., Gross H. J. Structural studies on tRNA acceptor stem microhelices: exchange of the discriminator base A73 for G in human tRNA^{Leu} switches the acceptor specificity from leucine to serine possibly by decreasing the stability of the terminal G1-C72 base pair // Nucl. Acids Res.—1997.—25, N 22.—P. 4551—4556.
 31. Quigley G. J., Rich A. Structural domains of transfer RNA molecules // Science.—1976.—194, N 4267.—P. 796—806.
 32. Romby P., Carbon P., Westhof E., Ehresmann C., Ebel J. P., Ehresmann B., Giege R. Importance of conserved residues for the conformation of the T-loop in tRNAs // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1987.—5, N 3.—P. 669—687.
 33. Ehresmann C., Baudin F., Mougel M., Romby P., Ebel J. P., Ehresmann B. Probing the structure of RNAs in solution // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 22.—P. 9109—9128

УДК 577.217.335

Надійшла до редакції 09.02.99