

Вивчення взаємодії проліл-тРНК синтетази *Thermus thermophilus* з гомологічною тРНК_{CGG}^{Pro} методами хімічної модифікації в розчині

С. П. Єгорова, І. А. Крикливий, О. П. Коваленко, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
mtukalo@imbg.org.ua

*Методами хроматографії виділено дві ізоакцепторні тРНК^{Pro} з *T. thermophilus* HB8 чистотою біля 95 і 97 % відповідно. Вивчено первинні структури тРНК_{CGG}^{Pro} і тРНК_{GGG}^{Pro} з *T. thermophilus*, які відрізняються між собою у 18 положеннях. Показано, що в розчині гомологічна проліл-тРНК синтетаза захищає від алкілювання етилнітрососечовиною фосфати тРНК_{CGG}^{Pro}, розташовані в D-стеблі (9, 10 і 13), на 5'-кінці антикодона стебла (26, 27, 28 і 29), в антикодонавій петлі (34, 35, 37 і 38) і з 3'-боку акцепторного стебла (67, 68).*

*Ключові слова: проліл-тРНК синтетаза, тРНК^{Pro}, *Thermus thermophilus*, хроматографія, алкілювання етилнітрососечовиною, авторадіографія.*

Вступ. Проліл-тРНК синтетаза (ProPC) каталізує аміноацилювання гомологічної тРНК^{Pro} за двостадійним механізмом, який включає активування амінокислоти з утворенням проліл-аденілату і подальшим перенесенням проліну на 3'-кінцевий аденозин гомологічної тРНК.

Пролін (пролідін-2-карбонова кислота) за своєю хімічною структурою є імінокислотою. Характерною відмінністю проліну серед 20 -амінокислот, виявлених у складі білків, є те, що атом азоту, який утворює пептидний зв'язок, також бере участь в утворенні піролідинового кільця проліну. Це приводить до того, що у місці пептидного зв'язку, утвореного за участі проліну, відбувається різкий поворот (злам) поліпептидного ланцюга, який таким чином значною мірою визначає просторову структуру білкової молекули. Тому точність аміноацилювання гомологічної тРНК^{Pro} проліном

особливо важлива. Однак у випадках, коли амінокислоти мають незначні структурні відмінності (наприклад, різняться за метильною групою), ProPC, як і деякі інші APCази, не здатна досягти повної дискримінації і може помилятися – або активувати подібну негомологічну амінокислоту (аланін, цистеїн), [1, 2] або аміноацилювати тРНК негомологічною амінокислотою.

ProPC поряд з GlyPC, HisPC, SerPC і ThrPC належить до Па класу [3, 4] і функціонує у вигляді ₂-гомодимеру. Характерною рисою синтетаз Па класу є те, що всі вони (окрім SerPC) мають гомологічний С-кінцевий антикодон-зв'язувальний домен, до складу якого входить біля 100 амінокислотних залишків. Просторова локалізація цього домену відносно каталітичного домену значно варіює. Так, у HisPC він з'єднаний з каталітичним доменом довгим пептидом і розташований винятково проти активного центра другої субодиниці, у GlyPC – проти обох субодиниць, а у ProPC – проти активного центра тієї ж субодиниці. Виникає питання:

яким чином відбувається впізнавання і зв'язування тРНК синтетазами Па класу і як вони взаємодіють з антикодоном тРНК?

Визначення методами рентгеноструктурного аналізу просторових структур HisPC *Escherichia coli* і *T. thermophilus* [5, 6] та GlyPC *T. thermophilus* [7] дало можливість на основі вивчення поверхневих електростатичних потенціалів побудувати лише гіпотетичну модель зв'язування тРНК синтетазами Па класу. Крім того, філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей проліл-тРНК синтетаз різного походження показав, що їх можна віднести до двох структурних форм, які досить рано дивергували в процесі еволюції [8, 9]. У прокаріотоподібних ProPC, які мають великі включення між структурними мотивами 2 і 3, відсутній С-кінцевий домен; у еукаріото-археподібних немає включень між мотивами 2 і 3, але вони містять типовий для Па класу С-кінцевий домен.

Нами одержано кристали комплексів тРНК_{CGG}^{Pro} і тРНК_{GGG}^{Pro} з ProPC *T. thermophilus* та визначено їхні просторові структури [9]. Це були перші структурні дані, що показали, яким чином відбувається впізнавання антикодону тРНК синтетазою Па класу. Зіставлення одержаних даних зі структурою нативної ProPCTT (0,243 нм) і її комплексу з проліном (0,29 нм) [10] виявило низку нових властивостей синтетаз Па класу. С-кінцевий домен є Zn-зв'язувальним. Встановлено, що в кристалі знаходиться тільки одна молекула тРНК на димер ферменту. Антикодон тРНК добре структурований, антикодонова петля компактна, а взаємодіють з ферментом лише три основи антикодонової петлі – G35, G36 і G37. При зв'язуванні з ферментом утворюються уотсон-кріківські пари основ U32-U38 (тРНК_{CGG}^{Pro}) або U32-A38 (тРНК_{GGG}^{Pro}), відсутні у вільній тРНК. Верхня частина антикодонового стебла перехресно контактує з другою субодиноцею димеру. Акцепторне стебло неупорядковане, акцепторний кінець не входить до активного центра і його положення чітко не визначене. Можливо, це обумовлено «неправильною» конфігурацією активного центра через відсутність у ньому проліну, оскільки при зв'язуванні останнього відбуваються значні конформаційні зміни ферменту. Одержані дані підтвердили результати біохімічних

досліджень, згідно з якими основи G35 і G36 є елементами впізнавання тРНК^{Pro} синтетазою [11]. Однак для ефективного аміноацилювання повинні бути додаткові контакти ферменту з тРНК, які включають D- і акцепторне стебла. Крім того, завжди виникають сумніви відносно тотожності структур біомакромолекул у кристалі і в розчині. Для розуміння механізму аміноацилювання тРНК синтетазами Па класу необхідно визначити, яким чином антикодон-зв'язувальний домен позиціонує акцепторний кінець тРНК і забезпечує ефективне аміноацилювання.

Метою даної роботи є вивчення взаємодії тРНК^{Pro} з проліл-тРНК синтетазою *T. thermophilus* у розчині методом хімічної модифікації. Нітрозоетилсечовина на сьогодні є одним із кращих реагентів для дослідження взаємодії тРНК з аміноацил-тРНК синтетазою, тому що однаково модифікує основи тРНК в одно- та двоспиральних ділянках.

Матеріали і методи. У роботі використано такі матеріали і прилади: бензоїльована ДЕАЕ целюлоза (БД-целюлоза) («Serva», Німеччина); сефароза 4В («Pharmacia Fain Chemicals», Швеція); NaCl, MgCl₂ («Fisher», США); діетилпірокарбонат, фенілметилсульфонілфторид («Calbiochem», США); 2-меркаптоетанол, дитіотреїтол («Merk», Німеччина); фільтри GF/C, діетиламіоетилцелюлоза («Whatman», Англія), ізопропіловий спирт «осч», ¹⁴C-пролін (239 Кі/моль), [-³²P]АТФ, [-³²P]АТФ з питомою активністю 2000–3000 Кі/ммоль («Amersham», Англія); диметилсульфат, гідразин («Fluka», Швейцарія); трис, боргідрид натрію («Serva», Німеччина); фосфодіестераза отрути змії (КФ 3.1.4.1), лужна фосфатаза з *E. coli* (КФ 3.1.3.1) («Sigma», США); T₁-РНКаза (КФ 3.1.27.3) («Sankyo», Японія); фосфодіестераза отрути змії (КФ 3.1.4.1) («Worthington», США); полінуклеотидкіназа фага T4 (КФ 2.7.1.78) («Pharmacia», Швеція); тРНК-нуклеотидилтрансфераза дріжджів (ІМБіГ НАН України). Всі інші реагенти мали кваліфікацію «осч» і «хч». Етилнітрозосечовина, синтезована А. Г. Терентьєвим (ІМБіГ НАН України); рентгенівська плівка фірми «Codak» (США).

Розчини готували на бідистильованій воді. Перелік використаних приладів: центрифуга К-70

(Німеччина); центрифуга Jouan MR 14.11 («Jouan» Франція); спектрофотометр «Specord UVVIS» (Німеччина); хроматографічне обладнання «Gold-System» та високоефективні хроматографічні колонки Spherogel TSK DE 5PW 2,0 15 см, Ultrapore RPMS C8 1,0 25 см («Beckman», США); електрофорез Macrophor 2010, сцинтиляційний лічильник Rackbeta, денситометр UltraScan XL («LKB», Швеція).

Для виділення проліл-тРНК синтетази, сумарної тРНК, малоочищеного ферменту для тестування тРНК і високоочищеної проліл-тРНК синтетази клітини *T. thermophilus* штаму НВ-8 вирощували, як описано раніше [12, 13].

Виділення і очищення тРНК^{Pro} з *T. thermophilus* здійснювали у кілька етапів, які включали виділення сумарних препаратів тРНК із *T. thermophilus*, хроматографію на колонках з БД-целюлозою, оберненофазову хроматографію на сефарозі 4В і високоефективну рідинну хроматографію (HPLC) на колонках Spherogel-TSK DE 5PW і Ultrapore RPMS C8 за методиками, описаними раніше [12, 14, 15].

тРНК_{CGG}^{Pro} і тРНК_{GGG}^{Pro} з *T. Thermophilus* мітили радіоактивним фосфором з боку 3'-кінця, використовуючи [5'-³²P]рСр і РНК-лігазу [16], [-³²P]АТР і тРНК-нуклеотидилтрансферазу [17], виділену, як описано в роботі [18]. З боку 5'-кінця тРНК^{Pro} мітили із застосуванням [-³²P] АТР у реакції кінкування [19].

Нуклеотидні послідовності тРНК_{CGG}^{Pro} і тРНК_{GGG}^{Pro} з *T. thermophilus* визначали двома методами секвенування міченої тРНК: специфічною хімічною деградацією [20, 21] і гідролізом тРНК специфічними ендонуклеазами [21, 22].

Алкілування ³²P-мічених тРНК_{CGG}^{Pro} і її комплексу з проліл-тРНК синтетазою здійснювали з використанням етилнітрососечовини за умов, що стабілізують просторову структуру тРНК і в той же час сприяють утворенню специфічного комплексу тРНК^{Pro}-проліл-тРНК синтетаза [23]. Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила: 50 мМ трис-НСl, рН 7,9, 5 мМ MgCl₂, 2,5 мМ 2-меркаптоетанол, 0,8 мкМ тРНК^{Pro}, 3,2 мкМ проліл-тРНК синтетазу і 2,5 мкл насиченого розчину етилнітрососечовини в етиловому спирті. Концентрація реагента становила 75 мМ. Алкілування тРНК (0,8 мкМ) за присут-

ності гомологічної ProРСТТ проводили протягом 2 год при $t = 37$ С і зупиняли додаванням 3 мкл 3 М ацетату натрію (рН 5,5). У контрольних дослідах замість етилнітрососечовини додавали еквівалентний об'єм етанолу, замість проліл-тРНК синтетази – гетерологічну аміноацил-тРНК синтетазу (3,2 мкМ). Після закінчення реакції ферменти видаляли фенольною екстракцією, тРНК осаджували додаванням 10 мкг глікогену і трьох об'ємів етилового спирту.

Алкілування тРНК за умов денатурації здійснювали у 25 мкл 0,3 М Na-какодилатного буфера (рН 8,0), який містив 0,1 мМ ЕДТА, протягом 2 хв за температури 80 С. Полінуклеотидний ланцюг розщеплювали за модифікованими основами в 10 мкл 0,1 М трис-НСl (рН 9,0) упродовж 5 хв при $t = 55$ С.

Отримані фрагменти тРНК розділяли електрофорезом у 12,5 %-му ПААГ у 5 мМ трис-боратному буфері (рН 8,3), який містив 1 мМ ЕДТА і 7 М сечовину, з подальшою радіоавтографією гелю. Електрофоретичні смуги ідентифікували, порівнюючи рухливість фрагментів з такою фрагментів, отриманих частковим гідролізом тРНК рибонуклеазою T₁. Інтенсивності електрофоретичних смуг на радіоавтографах гелів, які відображають ступінь модифікації фосфатів, визначали за допомогою сканувального денситометра «UltraScan XL» фірми «LKB» (Швеція).

Результати і обговорення. Виділення індивідуальних тРНК_{CGG}^{Pro} і тРНК_{GGG}^{Pro} з *T. thermophilus*. Одержання індивідуальних ізоакцепторних тРНК^{Pro} становить досить складне завдання через існування декількох ізоакцепторних форм тРНК^{Pro}, присутніх у загальному пулі сумарного препарату. тРНК^{Pro} з *T. thermophilus* виділяли та очищували у кілька хроматографічних стадій. При хроматографії на колонці з БД-целюлозою тРНК^{Pro} з *T. thermophilus* виходить у зоні високої оптичної густини і містить багато домішок інших тРНК. Тому на другому етапі використано оберненофазову хроматографію на сефарозі 4В, яка дозволила в значній мірі звільнитися від домішок, а головне – розділити тРНК^{Pro} і тРНК^{Lys} [15]. Наступне очищення здійснювали методом HPLC на колонці Spherogel-TSK DE 5PW. Остаточне очищення тРНК^{Pro} виконували на

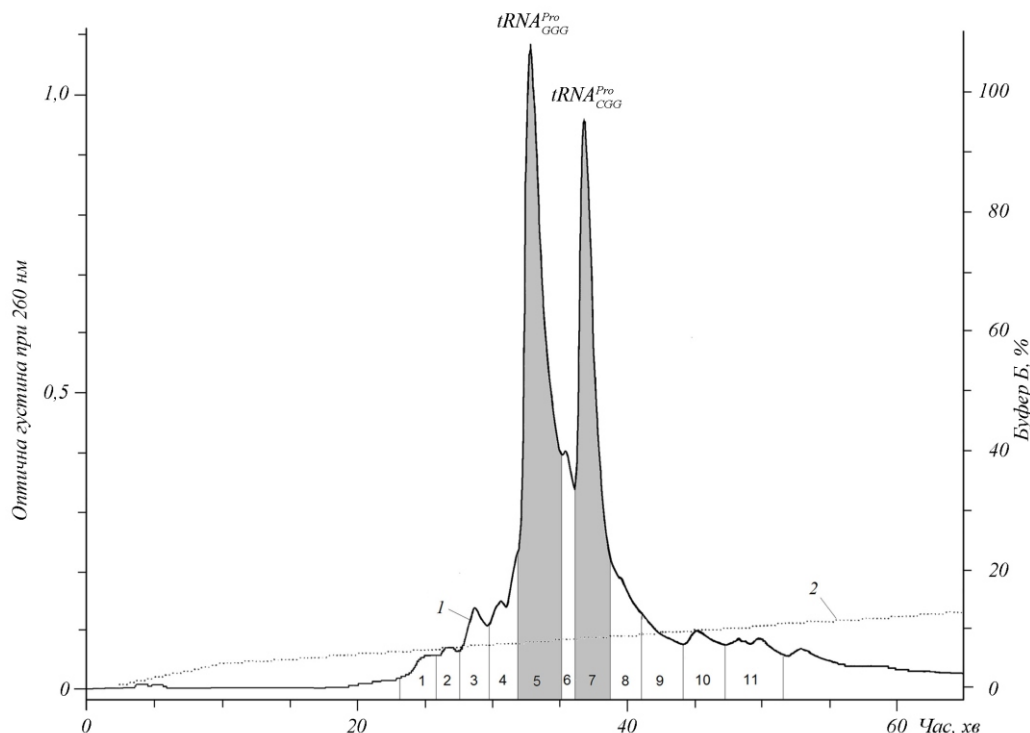


Рис. 1. Очищення індивідуальних тРНК^{Pro}_{CGG} і тРНК^{Pro}_{CGG} з *T. thermophilus* на колонці Ultrapore C8: 1 – поглинання при 260 нм; 2 – градієнт концентрації буфера Б. Зафарбовані піки містять тРНК^{Pro}_{CGG} і тРНК^{Pro}_{CGG} чистотою біля 95 і 97 % відповідно

колонці Ultrapore C8, у результаті якого одержано дві ізоакцепторні тРНК^{Pro} з *T. thermophilus* – тРНК^{Pro}_{CGG} і тРНК^{Pro}_{CGG} (рис. 1). Чистота одержаних препаратів становить біля 95 і 97 % (1505 і 1545 пмоль/1 о. о.), відповідно.

Визначення нуклеотидних послідовностей тРНК^{Pro}_{CGG} і тРНК^{Pro}_{CGG} з *T. thermophilus*. Нуклеотидні послідовності тРНК^{Pro}_{CGG} і тРНК^{Pro}_{CGG} з *T. thermophilus* визначали з використанням двох методів секвенування міченої тРНК: специфічної хімічної деградації [20, 21] і гідролізу тРНК специфічними ендонуклеазами [21, 22]. В результаті проведеної роботи встановлено повні нуклеотидні послідовності тРНК^{Pro}_{CGG} і тРНК^{Pro}_{CGG} з *T. thermophilus*. На рис. 2 наведено первинні структури у вигляді листка конюшини. В складі кожної тРНК^{Pro} налічується 77 нуклеотидних основ. При порівнянні їхніх структур виявлено 18 положень, за якими вони відрізняються (на рис. 2 виділено жирним курсивом). Найбільша різниця спостерігається в антикодоновому стеблі (8) і Т-стеблі (4), по дві відмінності знайдено в антикодоновій петлі і акцепторному стеблі та по одній – в D-петлі і акцепторному кінці. тРНК^{Pro} з *T. thermophilus* мають характерні риси прокаріотних тРНК^{Pro}: перша пара

CG в акцепторному стеблі та специфічна структура D-стебла. Гомологія первинної структури тРНК^{Pro}_{CGG} з відповідною ізоакцепторною тРНК^{Pro}_{CGG} з *E. coli* становить 78 %.

Таким чином, пролінова система в *T. thermophilus* є унікальною з огляду на те, що ProPCTT належить за своїми структурними особливостями до еукаріото-археподібної форми, у той час як гомологічна їй тРНК^{Pro} входить до прокаріотної групи тРНК^{Pro}. Отже, дослідження впізнавання тРНК^{Pro} аміноацил-тРНК синтетазою надзвичайно цікаве з еволюційної точки зору.

Вивчення взаємодії проліл-тРНК синтетази *T. thermophilus* з гомологічною тРНК^{Pro}_{CGG} у розчині. Вибір тРНК^{Pro}_{CGG} з *T. thermophilus* базується на результатах вивчення комплексів ProPCTT з обома ізоакцепторними тРНК^{Pro} методом рентгеноструктурного аналізу [9]. Кристали комплексу ProPCTT-тРНК^{Pro}_{CGG} з *T. thermophilus* мали краще розділення і виявилися більш інформативними. Отримані результати надали можливість побудувати просторову модель комплексу. Дані рентгеноструктурного аналізу кристалів комплексу ProPCTT-тРНК^{Pro}_{CGG} з *T. thermophilus* повністю відповідають моделі, побудованій для комплексу

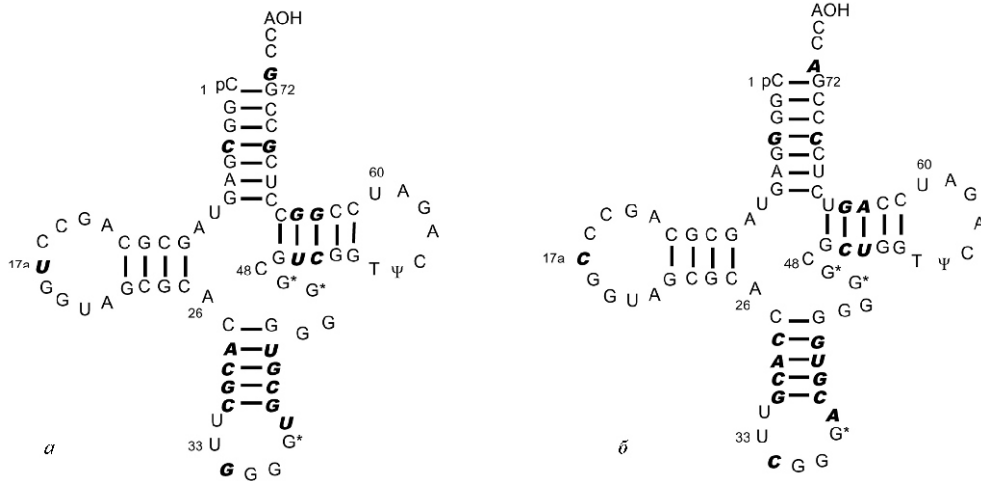


Рис. 2. Первинні структури тРНК_{GGG}^{Pro} (а) і тРНК_{CGG}^{Pro} (б) з *T. thermophilus* у вигляді листа конюшини. Нуклеотиди, за якими відрізняються дві ізоакцепторні тРНК^{Pro}, виділено жирним курсивом

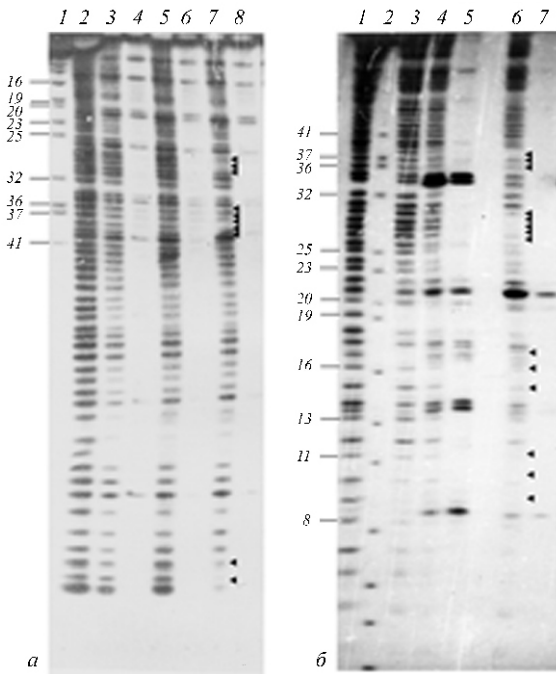


Рис. 3. Радиоавтографи 12,5 %-го ПААГ, в якому розділено фрагменти 3'-міченої (а) і 5'-міченої (б) тРНК_{CGG}^{Pro} з *T. thermophilus*, отримані після алкілювання етилнітрососечовиною (а: алкілювання за умов, які стабілізують просторову структуру тРНК (3, 5) при денатурації (2) та за присутності гомологічної проліл-тРНК синтетази (7); відповідні контрольні інкубації (4, 6, 8) за відсутності етилнітрососечовини; 1 – тРНК_{CGG}^{Pro}, частково гідролізована нуклеазою T₁; б: алкілювання за умов, які стабілізують просторову структуру тРНК (3, 4) при денатурації (1) та за присутності гомологічної проліл-тРНК синтетази (6); відповідні контрольні інкубації (5, 7) за відсутності етилнітрососечовини; 2 – тРНК_{CGG}^{Pro}, частковогідролізована нуклеазою T₁). Нумерація смуг відповідає положенню фосфатів у структурі тРНК_{CGG}^{Pro}. Трикутниками позначено смуги, рівень модифікування яких знижується за присутності проліл-тРНК синтетази

ProPCTT-тРНК_{CGG}^{Pro}. Ділянки контакту тРНК_{CGG}^{Pro} з проліл-тРНК синтетазою вивчали алкілюванням етилнітрососечовиною вільної тРНК^{Pro} та за присутності гомологічної аміноацил-тРНК синтетази. Реакції алкілювання тРНК проводили, як описано в «Матеріалах і методах».

На рис. 3 наведено радіоавтографи ПААГ після розділення фрагментів, отриманих внаслідок роз'єднання 3'-³²P-міченої (а) і 5'-³²P-міченої тРНК_{CGG}^{Pro} (б) з *T. thermophilus*, алкілованих нітросоетилсечовиною за відсутності і в присутності проліл-тРНК синтетази. Можна бачити, що модифікація деяких фосфатів відбувається в меншій мірі за присутності гомологічного ферменту порівняно з модифікацією вільної тРНК^{Pro} або в присутності гетерологічної синтетази. Варто зауважити, що смуги, які відповідають фосфатам, розміщеним ближче до кінців молекули тРНК, мають меншу інтенсивність як за присутності, так і відсутності ферменту. Це спричинене недоліком методу дослідження, який потребує осадження отриманих фрагментів етанолом, а за таких умов короткі фрагменти випадають в осад гірше, ніж довгі. Однак вивчення інтенсивностей електрофоретичних смуг за допомогою сканувального денситометра та розрахунки відносних рівнів інтенсивностей відповідних смуг за присутності і відсутності гомологічної ProPCTT (рис. 4) дають надійну інформацію щодо захисту фосфатів ферментом.

Розташування в структурі тРНК^{Pro} фосфатів, захищених від модифікації за присутності проліл-тРНК синтетази, представлено на рис. 5. З цього ри-

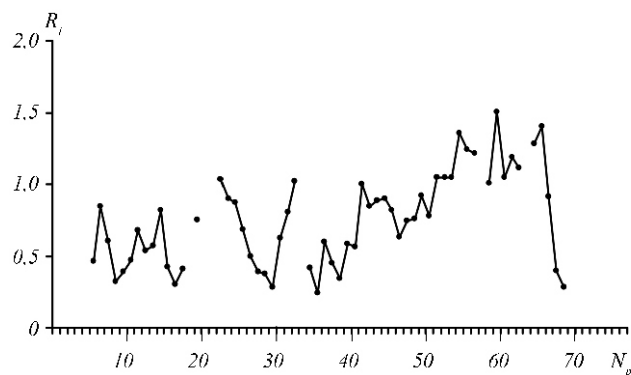


Рис. 4. Відносна реакційна здатність залишків фосфорної кислоти у тРНК_{CGG}^{Pro} з *T. thermophilus*. R_i – відношення інтенсивностей відповідних електрофоретичних смуг в експериментах з алкілювання вільної тРНК_{CGG}^{Pro} і за присутності гомологічної проліл-тРНК синтетази; N_p – номери фосфатів

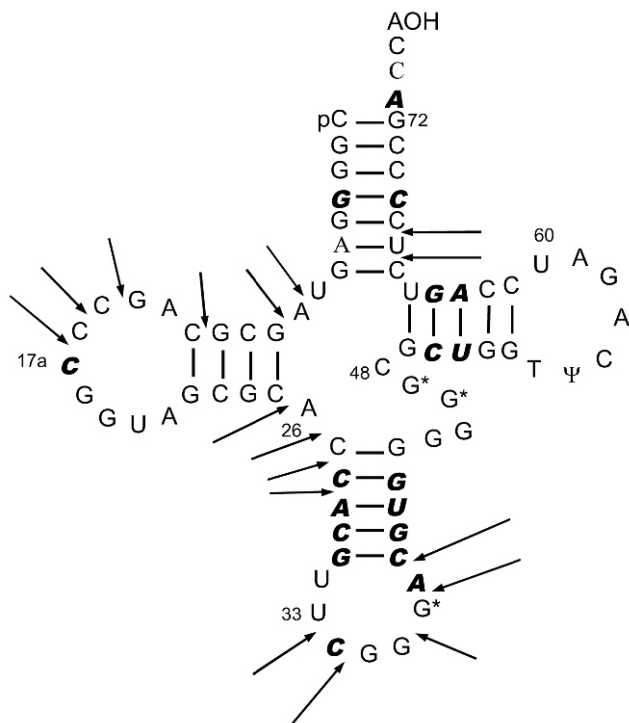


Рис. 5. Структура тРНК_{CGG}^{Pro} з *T. thermophilus* у вигляді листа конюшини. Стрілками позначено фосфати, які захищаються проліл-тРНК синтетазою від алкілювання етилендіаміноетаною. Нуклеотиди, за якими вона відрізняється від тРНК_{CGG}^{Pro}, вирізняє жирним курсивом

сунка можна бачити, що фосфати тРНК_{CGG}^{Pro}, які мають низьку здатність до алкілювання за присутності ProPSTT, розташовані в положеннях з 5'-боку D-стебла і D-петлі (9, 10, 13, 16, 17, 17a), з боку 5'-кінця антикодонового стебла (26, 27, 28 і 29), в антикодоновій петлі (34, 35, 37 і 38) і з 3'-боку ак-

цепторного стебла (67, 68). Участь у взаємодії з проліл-тРНК синтетазою основ антикодону, 5'-боку антикодонового стебла і 3'-боку акцепторного стебла підтверджується також методом захисту тРНК від гідролізу РНКазами (даних не наведено). Проте треба зазначити, що в кристалічній структурі комплексу відсутні прямі контакти D-петлі з ферментом, тому зниження реакційної здатності фосфатів 16, 17 і 17a пов'язано з тим, що вони беруть участь у стабілізації відповідної конформації D-петлі, яка виникає при взаємодії тРНК з ферментом. На нашу думку, така конформація D-петлі є стабільнішою при утворенні комплексу з синтетазою. Одержані дані засвідчують, що місця контактів тРНК з синтетазою розташовані з боку великої боріздки антикодонового стебла і що антикодон є ключовим у взаємодії тРНК^{Pro} з гомологічною проліл-тРНК синтетазою.

Отримані дані добре узгоджуються з результатами вивчення кристалічних комплексів методами рентгеноструктурного аналізу [9]. Основні контакти між антикодон-зв'язувальним доменом ProPSTT і тРНК^{Pro} утворені -листом і двома -спіралями ферменту, спрямованими до антикодонової петлі з боку великої боріздки тРНК. Гідрофобна кишеня, яка специфічно зв'язує основи антикодону G35 і G36, утворена залишками Ile295, Pro322 і Phe336. В упізнаванні антикодону тРНК^{Pro} також беруть участь Lys353, Asp354, Glu349, Lys297 і Thr331, які утворюють водневі зв'язки з основами антикодону або взаємодіють з фосфатами. Варто відзначити, що майже всі перераховані залишки є консервативними для відомих еукаріото-археподібних ProPC.

Основи G35 і G36 є елементами впізнавання для ProPC. Як показано біохімічними дослідженнями, заміна цих основ на інші призводить до падіння ефективності аміноацилювання у 9–164 рази для прокаріотної ProPC і в 300–1100 разів – для еукаріотної [11].

Отримані результати вказують на важливу роль рибозофосфатного каркасу та просторової конфігурації тРНК^{Pro} в процесах упізнавання її гомологічним ферментом. Показано також взаємодію залишків ферменту з основами G₃₅ і G₃₆ тРНК^{Pro}. Важливим наслідком даних досліджень можна вва-

жати захист від модифікації фосфатів 67 і 68, розташованих в акцепторному стеблі. За даними рентгеноструктурного аналізу, акцепторне стебло тРНК^{Pro} не має прямих контактів з ферментом, а просторова локалізація акцепторного кінця не визначена. Однак у результаті конформаційних змін, які супроводжують зв'язування проліну, фосфати 67 і 68 можуть взаємодіяти з Arg146 і Arg148 та фіксувати акцепторне стебло у положенні, що забезпечує ефективне аміноацилювання. Треба відмітити, що в просторовій структурі ProPC *Enterococcus faecalis* (ProPCEF) положення Arg146 займає Arg102 і відповідно до комп'ютерної моделі комплексу ProPCEF-тРНК^{Pro} ці залишки амінокислот беруть участь у взаємодії з рибозофосфатним скелетом акцепторного стебла тРНК^{Pro} в оточенні 68-го фосфату [24]. В останній моделі відбуваються також взаємодії ферменту з рибозофосфатним скелетом в оточенні 10-го і 13-го фосфатів та фосфатів з 5'-боку антикодонового стебла і антикодонової петлі, що відповідає даним, одержаним нами для тРНК^{Pro} з *T. thermophilus*. Таким чином, як первинна структура тРНК^{Pro} з *T. thermophilus*, так і її взаємодія з гомологічною синтетазою мають особливості тРНК^{Pro} прокариотного типу.

В результаті виконаних досліджень виявлено низку нових деталей взаємодії ProPC з тРНК^{Pro}, що разом з даними рентгеноструктурного аналізу дозволяють окреслити механізм, за яким синтетаза Па класу взаємодіє з тРНК, як антикодон-зв'язувальний домен ProPC взаємодіє з антикодоном тРНК. Для подальших досліджень бажано вивчити потрійний комплекс пролін-ProPC-тРНК^{Pro}, що повинно сприяти фіксації акцепторного кінця тРНК в каталітичному центрі ферменту.

S. P. Egorova, I. A. Krikliyiv, O. P. Kovalenko, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Study on interaction of *Thermus thermophilus* prolyl-tRNA synthetase with homologous tRNA_{CGG}^{Pro} by methods of chemical modification in solution

Summary

Two isoaccepting *Thermus thermophilus* HB8 tRNA^{Pro} were isolated by the chromatography methods with purity about 95 and 97%. The primary structures of isoaccepting tRNA_{CGG}^{Pro} and tRNA_{CGG}^{Pro} were studied by the gel-sequencing method, and differences between them were found in 18 positions. Our results show that in solution the homologous prolyl-tRNA synthetase

protects the phosphates allocated in D-stem (9, 10, 13), 5'-end of anticodon-stem (26-29), anticodon-loop (34, 35, 37-39) and acceptor-stem (67, 68) of tRNA_{CGG}^{Pro} from alkylation by ethylnitrosourea.

Keywords: prolyl-tRNA synthetase, mPHK^{Pro}, *Thermus thermophilus*, chromatography, autoradiography, ethylnitrosourea.

C. П. Егорова, И. А. Крикливый, О. П. Коваленко, А. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Изучение взаимодействия пролил-тРНК синтетазы *Thermus thermophilus* с гомологичной тРНК_{CGG}^{Pro} методами химической модификации в растворе

Резюме

Методами хроматографии выделены две изоакцепторные тРНК^{Pro} из *T. thermophilus* HB8 чистотой около 95 и 97% соответственно. Изучены первичные структуры тРНК_{CGG}^{Pro} и тРНК_{CGG}^{Pro} из *T. thermophilus*, отличающиеся между собой в 18 положениях. Показано, что в растворе гомологичная пролил-тРНК синтетаза защищает от алкилирования этилнитрозомочевинной фосфаты тРНК_{CGG}^{Pro}, расположенные в D-стебле (9, 10 и 13), на 5'-конце антикодонового стебля (26, 27, 28 и 29), в антикодоновой петле (34, 35, 37 и 38) и с 3'-стороны акцепторного стебля (67 и 68).

Ключевые слова: пролил-тРНК синтетаза, тРНК^{Pro}, *Thermus thermophilus*, хроматография, алкилирование этилнитрозомочевинной, автордиография.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Beuning P. J., Musier-Forsyth K. Hydrolytic editing by a class II aminoacyl-tRNA synthetase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2000.—97.—P. 8916–8920.
2. Ahel I., Stathopoulos C., Ambrogelly A., Sauerwald A., Toogood H., Hartsch T., Soll D. Cysteine activation is an inherent *in vitro* property of prolyl-tRNA synthetases // J. Biol. Chem.—2002.—277.—P. 34743–34748.
3. Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs // Nature.—1990.—347.—P. 203–206.
4. Cusack S., Berthet-Colominas C., Hartlein M., Nassar N., Leberman R. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å // Nature.—1990.—347.—P. 249–255.
5. Arnez J. G., Harris D. C., Mitschler A., Rees B., Francllyn C. S., Moras D. Crystal structure of histidyl-tRNA synthetase from *E. coli* complex with histidyl-adenylate // EMBO J.—1995.—14.—P. 4143–4155.
6. Aberg A., Yaremchuk A., Tukalo M., Rasmussen B., Cusack S. Crystall structure analysis of the activation of histidine by *Thermus thermophilus* histidyl-tRNA synthetase // Biochemistry.—1997.—36.—P. 3084–3094.
7. Logan D. T., Mazauric M.-H., Kern D., Moras D. Crystal structure of glycyl-tRNA synthetase from *T. thermophilus* // EMBO J.—1995.—14.—P. 4156–4167.
8. Woese C. R., Olsen G. J., Ibba M., Soll D. Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process // Mol. Biol. Rev.—2000.—64. P. 202–236.

9. Yaremchuk A., Cusack S., Tukalo M. Crystal structure of a eukaryote/archaeon-like prolyl-tRNA synthetase and its complex with RNA(Pro)(CGG) // *EMBO J.*—2000.—**19**.—P. 4745–4758.
10. Cusack S., Yaremchuk A., Krikliiviy I., Tukalo M. tRNA^{Pro} antikodon recognition by *Thermus thermophilus* prolyl-tRNA synthetase // *Structure.*—1998.—**6**.—P. 101–108.
11. Liu H., Peterson R., Kessler J., Musier-Forsith K. Molecular recognition of tRNA^{Pro} by *E. coli* proline tRNA synthetase *in vitro* // *Nucl. Acids Res.*—1995.—**23**.—P. 165–169.
12. Крикливий І. А., Коваленко О. П., Гудзера О. Й., Яремчук Г. Д., Тукало М. А. Виділення і очищення ізоакцепторних форм тРНК₁^{Ser} і тРНК₂^{Ser} із *Thermus thermophilus* // Біополімери і клітина.—2006.—**22**, № 6.—С. 425–432.
13. Yaremchuk A., Cusack S., Tukalo M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Thermus thermophilus* prolyl-tRNA synthetase // *Acta Cryst.*—2000.—**D56**.—P. 195–196.
14. Гудзера О. И., Крикливый И. А., Яремчук А. Д., Тукало М. А. Выделение гистидиновой тРНК из *Thermus thermophilus* и изучение ее первичной структуры и участков взаимодействия у гомологичной аминоацил-тРНК синтетазы // Біополімери і клітина.—2006.—**22**, № 3.—С. 201–209.
15. Крикливий І. А., Коваленко О. П., Гудзера О. Й., Яремчук Г. Д., Тукало М. А. Виділення і очищення індивідуальної тРНК^{Lys} із *Thermus thermophilus* та визначення її мінорних основ // Біополімери і клітина.—2008.—**24**, № 1.—С. 21–27.
16. Bruce A. G., Uhlenbeck O. S. Reactions at the termini of the tRNA with T4 RNA ligase // *Nucl. Acids Res.*—1978.—**5**.—P. 3665–3677.
17. Silberklang M., Gillum A. M., Raj Bhandary U. L. The use nuclease P1 in sequence analysis of end group labeled tRNA // *Nucl. Acids Res.*—1977.—**4**.—P. 4091–4108.
18. Rether B., Bonnet J., Ebel J. P. Studies on tRNA nucleotidyltransferase from baker's yeast 1. Purification of the enzyme. Protection against thermal inactivation and inhibition by several substrates // *Eur. J. Biochem.*—1974.—**50**.—P. 281–288.
19. Vlasov V. V., Giege R., Ebel J. P. Tertiary structure of tRNA in solution monitored phosphodiester modification with ethylnitrosourea // *Eur. J. Biochem.*—1981.—**119**.—P. 51–59.
20. Peattie D. A. Direct chemical method for sequencing RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—**76**.—P. 1760–1764.
21. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Mapping adenines, guanosines and pyrimidines in RNA // *Nucl. Acids Res.*—1977.—**4**.—P. 2527–2538.
22. Lockard R. E., Alzner-Debeverd B., Heckman J. E., Mac-Gee J., Tabor M. W., Raj Bhandary U. L. Sequence analysis of 5' ³²P labeled mRNA and tRNA using polyacrylamide gel electrophoresis // *Nucl. Acids Res.*—1978.—**5**.—P. 37–56.
23. Vlasov V. V., Korn D., Giege P., Ebel J.-P. Protection of phosphodiester bonds in yeast tRNA^{Val} by its cognate aminoacyl-tRNA synthetase against alkylation by ethylnitrosourea // *FEBS Lett.*—1981.—**123**.—P. 277–281.
24. Crepin T., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. Structures of two bacterial prolyl-tRNA synthetases with and without a cis-editing domain // *Structure.*—2006.—**14**.—P. 1511–1525.

УДК 577.217.335

Надійшла до редакції 15.07.08