

Е. И. Черепенко

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ ФЕНИЛАЛАНИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ПОМОЩЬЮ ПЛАЗМИД *COLE1*-РЯДА

Изучена способность РНК I, контролирующей репликацию *CoIE1*-репликона и имеющей тРНК-подобную структуру, а также гомологичные молекуле тРНК^{Phe} участки, комплементировать термочувствительную фенилаланил-тРНК синтетазу *E. coli in vivo*, поскольку известно, что таким свойством обладает молекула тРНК^{Phe}. Показано, что клетки, содержащие термолабильный фермент и трансформированные плазмидами *pUC19* и *pBR322*, могут расти в непермиссивных условиях (42 °С) при выращивании всех клеток, участвовавших в трансформационной процедуре, в течение ночи с аэрацией в разбавленном мясном бульоне.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы (АРСаза) из-за присущей им способности безошибочного отбора среди множества стереотипных молекул соответствующих партнеров реакции аминокислотирования — молекул тРНК и аминокислоты — стали классическим объектом в молекулярной биологии при изучении механизмов молекулярного узнавания. В настоящее время доминирующее направление в исследовании этих механизмов составил поиск с помощью методов геной инженерии и рентгеноструктурного анализа отдельных участков — специфических детерминант структуры молекулы как тРНК, так и фермента, ответственных за правильное узнавание и гомологическое взаимодействие [1, 2]. Однако и классические биохимические методы позволяют получить информацию, необходимую при решении проблемы молекулярного узнавания [3]. Такую информацию представляет анализ характера термоинактивации фермента в зависимости от количественного и качественного содержания субстрата — молекул тРНК. Впервые изменение кинетики тепловой инактивации АРСаз *in vitro* с помощью тРНК было показано в работе [4], что позволило изучать закономерности образования комплекса тРНК — АРСаза. Получение температурочувствительных мутантов клеток *E. coli* с дефектами в АРСазах, обуславливающими их термолабильность, продемонстрировало, что и *in vivo* возрастание содержания в клетке гомологичной тРНК, происходящее в результате увеличения числа копий гена, кодирующего данную тРНК, способно защитить фермент от действия повышенной температуры [5]. Этот факт был успешно использован при клонировании генов тРНК^{Phe} [6, 7]. В настоящее время еще неясно, как происходит восстановление функции фермента в непермиссивных условиях. С одной стороны, известно, что конформеры гомологичной тРНК^{Leu} эукариот, неактивные в процессе трансляции, не только не предотвращают термоинактивации, а, напротив, увеличивают термочувствительность фермента [8]. С другой стороны, в случае тРНК^{Phe} *E. coli* показано, что лишь та тРНК активна, у которой G15, G44 и m⁷G46 не заменены на А [9]. Следовательно, при изучении механизма температурной защиты АРСазы с помощью тРНК важно знать характер точечных взаимодействий и порог возможности изменения общей пространственной организации молекулы тРНК. В связи с этим интерес вызывают тРНК-подобные структуры, обладающие консенсусными с тРНК участками

© Е. И. ЧЕРЕПЕНКО, 1994

и участками, резко отличающимися. Примером может служить РНК I, контролирующая репликацию *ColE1*-плазмид в клетках *E. coli*. Обратив внимание на то, что структура РНК I напоминает «клеверный лист», авторы работы [10] сравнили нуклеотидные последовательности РНК I и тРНК *E. coli* и обнаружили большую степень гомологии. Мы же исходили из того, что имеется 45 % гомологии РНК I и тРНК^{Phe} с наличием нескольких консенсусных участков.

Целью данного исследования было изучение возможности роста клеток *E. coli*, содержащих термолабильную ФРС, в непермиссивных условиях за счет введения в клетки плазмид, реплицирующихся при участии РНК I, подобной тРНК^{Phe}.

Материалы и методы. Штаммы и плазмиды. В работе использованы штаммы *E. coli* K-12: NP-37 — tonA22, ompF627, pheS6, (Ts), relA1, pit10, spoT1, T2^r; BD 1838 — tonA2, lacY1, supE44(glnV44), gal-6, λ⁻, rugD67, trp-82 tyrS600, his-214, argA52, rpsL185, xyl-7, mtl-2, thi-1, полученные от Dr. В. Wachman (Коллекционный центр штаммов *E. coli* США).

В работе также использованы коммерческие препараты ДНК плазмид *pBR322* и *pUC19* и препараты, получаемые нами методом кипячения и щелочным методом [11]. Клетки трансформировали препаратами ДНК данных плазмид с помощью обработки CaCl₂ на холоду [11] и выращивали в среде LB или разбавленном мясном бульоне, содержащем 10 мкг/мл тетрациклина или 150 мкг/мл ампициллина соответственно. На индикаторных X-gal чашках колонии *pUC19*-трансформантов имели синий цвет.

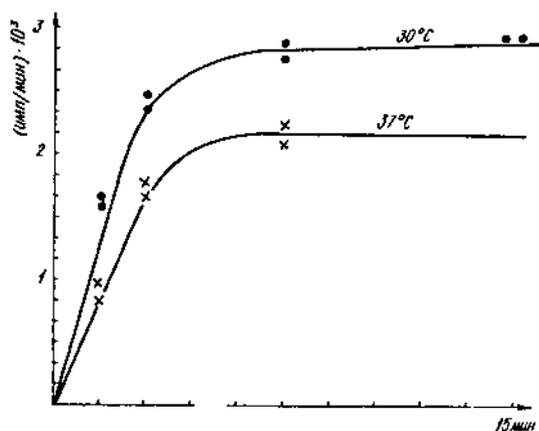
Аминоацилирующую активность ФРС определяли при 30 и 37 °С в S-30 экстрактах, полученных из трансформированных клеток NP-37, как описано в [7]. Инкубационная смесь (100 мкл) содержала 100 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 10 мМ АТФ, 0,1 мМ ¹⁴C-Phe (ЧССР, 1982 г., удельная активность 20 МБк/ммоль), 150 мкг суммарной тРНК. Реакцию проводили в течение 15 мин, осаждали стандартно, наносили на фильтры GF/C и определяли радиоактивность общепринятым методом.

Результаты и обсуждение. Приступая к экспериментальной проверке вопроса о том, может ли тРНК-подобная структура типа РНК I *ColE1*-репликона, имеющая гомологию с тРНК^{Phe} (V или U), комплектировать ts-аллель ФРС штамма NP-37 (т. е., что клетки, содержащие такой фермент, смогут расти в непермиссивных условиях), мы исходили из того, что в обычных при клонировании манипуляциях такие события происходят не часто. В противном случае они были бы замечены в контрольных образцах при клонировании фрагментов ДНК, содержащих гены ФРС оперона или гены тРНК^{Phe} (V, U). Действительно, рассеивая *pUC19*-трансформированные клетки соответственно с ts ФРС или ТирРС, мы заметили, что при эффективности трансформации 10⁵ на 1 мкг ДНК в случае ТирРС трансформанты при 42 °С никогда не появлялись. В случае же ФРС они появлялись с вероятностью 10⁻⁴. Для удобства мы перестали работать с твердыми средами и после 2 ч экспозиции в LB-среде без ампициллина при 30 °С [11] всю пробу переносили в 50 мл мясного бульона, разведенного в три раза физиологическим раствором и содержащего 150 мкг/мл ампициллина. Клетки инкубировали в течение ночи с аэрацией при 42 °С. Результаты мно-

Характер роста клеток E. coli, содержащих соответственно термолабильные ФРС и ТирРС и трансформированных плазмидами pUC19 и pBR322 в непермиссивных условиях

Штамм	АРСаза	Рост клеток контроля (42 °С)	Рост <i>pUC19</i> -трансформантов (42°С), кл/мл	Рост <i>pBR322</i> - трансформантов (42 °С), кл/мл
NP-37	ФРС	—	5 · 10 ⁸	5 · 10 ⁸
BD 1838	ТирРС	—	—	—

гократно проверенного и хорошо воспроизводимого эксперимента в такой типичной форме представлены в таблице. Если при внесении одинакового количества контрольных и трансформированных клеток в условиях двойной селекции (антибиотик и высокая температура) в контрольных пробах не наблюдалось никакого роста клеток, то *pUC19*-трансформированные клетки с термолабильной ФРС достигали максимальной плотности при аэрации в течение ночи при 42 °С. (Объем жидкой среды за время инкубации при такой температуре снижался значительно.) Однако при инкубации *pUC19*-трансформированных клеток, содержащих ТирРС, в течение ночи аналогично клеткам с термолабильной ФРС рост клеток также не отмечался. (Учитывая сильно выраженную ауксотрофность штам-



Температурная инактивация фенилаланил-тРНК синтетазы в S-30-экстрактах, полученных из *pUC19*-трансформированных клеток NP-37 и выращенных в течение ночи при 42 °С

ма с температурочувствительной ТирРС, проверяли способность данного штамма расти при использованных разведениях мясного бульона при перmissive температуре.)

Изучение аминокислотной активности ФРС в S-30-экстрактах, полученных из NP-37-трансформантов, выросших при 42 °С, показало, что фермент своих свойств не изменил и по-прежнему активен лишь при 30 °С (рисунок).

Следует отметить, что *pUC19*-трансформанты клеток NP-37, выращенные в течение ночи при 42 °С с аэрацией, легко пассировались в таких же условиях, и на протяжении трех пассажей не было замечено замедления скорости их роста. Однако при посеве штрихом максимально плотных культур на твердой среде рост наблюдался только в первом секторе, во втором — лишь отдельные колонии. При втором пассаже колонии не появлялись вообще.

Наряду с плазмидой *pUC19* наш типичный эксперимент был проведен с плазмидой *pBR322*, репликация которой также связана с РНК I. Несмотря на то, что для этих плазмид характерна различная копияность, действие плазмиды *pBR322* на рост клеток штамма NP-37 при 42 °С и отсутствие такового на рост клеток штамма BD 1838 были полностью аналогичны плазмиде *pUC19*. Возможно, замеченное свойство данных плазмид комплементировать термолабильную АРСазу не определяется копияностью в данных рамках. (Действительно, в работе [5] показан эффект защиты термочувствительной АРСазы в случае дупликации гена, кодирующего гомологичную тРНК.) Скорее всего, в этом случае оказывают влияние *relA*-фенотип штамма NP-37 и эмпирически сложившаяся концентрация в использованном мясном бульоне таких аминокислот, как гистидин, треонин, лейцин, аргинин, от которых зависит амплификация плазмиды *pBR322* [10].

Итак, проведенные феноменологические опыты по изучению возможности комплементации термолабильной ФРС с помощью РНК I, контролирующей репликацию *ColE1*-репликона и относящейся к классу тРНК-подобных структур, а также имеющей участки гомологии с тРНК^{Phe}, выявили условия, при которых можно наблюдать такую комплементацию. Отсутствие эффекта действия указанных плазмид, способствующих росту при неперmissive температурах клеток с термолабильной ТирРС, может служить доказательством специфичности об-

наруженной комплементации. Ясно, что приведенные здесь данные вызывают интерес к изучению подобной комплементации с использованием индивидуальных молекул APCазы и РНК I как на уровне целых молекул, так и их частей.

О. И. Черепенко

ЗАПОБИГАННЯ ТЕРМОІНАКТИВАЦІ ФЕНІЛАЛАНІЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ESCHERICHIA COLI ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛАЗМІД COIE1-РЯДУ

Резюме

Вивчено здатність РНК I, яка контролює реплікацію ColE1-реплікона та має тРНК-подібну структуру і гомологічні молекулі тРНК^{Phe} длянки, комплементувати термо-чутливу фенілаланіл-тРНК синтетазу *E. coli in vivo*, оскільки відомо, що подібна властивість притаманна молекулі тРНК^{Phe}. Показано також, що клітини, які містять термолабільний фермент і трансформовані плазмідами *pUC19* і *pBR322*, можуть рости в неперемисливих умовах (42°C) при вирощуванні всіх клітин, залучених до трансформційної процедури, протягом ночі з аерацією в розбавленому м'ясному бульйоні.

E. I. Cherepenko

COIE1 PLASMIDS CAN PREVENT THERMOINACTIVATION OF PHENYLALANYL-tRNA SYNTHETASE IN ESCHERICHIA COLI

Summary

Because RNA I controlling *ColE1* plasmid replication is tRNA-like structure and has consensus and homological sequences of tRNA^{Phe} we studied the ability of this molecule to complement thermolabile phenylalanyl-tRNA synthetase *in vivo* just like tRNA^{Phe} can do.

We showed that cells containing this enzyme and transformed with *pUC19* and *pBR322* plasmids could grow at 42°C when grown overnight with aeration in diluted meat broth incubating all transformants at a once which resulted from transformation procedure being diluted by a factor of 50.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Черепенко Е. И., Мацука Г. Х. Гены аминоксил-тРНК-синтетаз прокариот и эукариот // Успехи биол. химии.—1989.—30.—С. 67—105.
2. Schimmel P. Functional analysis of RNA and protein determinants for aminoacylation // 15th International tRNA Workshop (1993, May 30—June 4).—Cap d'Agde, 1993.—P. 150.
3. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Гудзера О. И. и др. Определение участков взаимодействия тРНК^{Leu} из молочной железы коров с гомологичной аминоксил-тРНК-синтетазой методом химической модификации // Биоорг. хими.—1990.—16, № 12.—С. 1647—1652.
4. Фаворова О. О., Гречко В. В., Киселев Л. Л., Сахарова Н. К. Изучение кинетики термоннактивации аминоксил-тРНК синтетаз *in vitro* // Докл. АН СССР.—1966.—171.—С. 742—745.
5. Morgan S., Körner N., Low K., Söll D. Regulation of biosynthesis of aminoacyl-tRNA synthetases and of tRNA in *Escherichia coli*. I. Isolation and characterization of a mutant with elevated levels of tRNA^{Gln} // J. Mol. Biol.—1977.—117.—P. 1073.
6. Schwartz I., Klotzky P., Elseviers D. et al. Molecular cloning and sequencing of pheU, a gene for *Escherichia coli* tRNA^{Phe} // Nucl. Acids Res.—1983.—11.—P. 4379—4389.
7. Caillet J., Plumbridge J., Springer M. Evidence that pheV, a gene for tRNA^{Phe} of *E. coli* is transcribed from tandem promoters // Ibid.—1985.—13, N 10.—P. 3699.
8. Негруцкий Б. С., Ельская А. В. Особенности тепловой инактивации лейцил-тРНК-синтетазы из печени кролика в присутствии различных конформеров тРНК // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.—С. 1297—1300.
9. Delamarque Ch., Vacher J., Buckingham R. Mutants affecting tRNA^{Phe} from *Escherichia coli* // Eur. J. Biochem.—1987.—168.—P. 365—369.
10. Yavachev L., Ivanov I. What does homology between *E. coli* tRNAs and RNAs controlling ColE1 plasmid replication mean? // J. Theor. Biol.—1988.—131.—P. 235.
11. Манингус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—443 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев

Получено 31.01.94