

Изучение участков взаимодействия тРНК₂^{Ser} из *Thermus thermophilus* с серил-тРНК синтетазой методом химической модификации

О. П. Коваленко, З. М. Петрушенко, Н. Н. Мальченко,
И. А. Крикливый, А. Д. Яремчук, М. А. Тукало

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

*Изучена реакционная способность остатков фосфорной кислоты тРНК₂^{Ser} из *T. thermophilus*, находящейся в комплексе с серил-тРНК синтетазой. Серил-тРНК синтетаза из *T. thermophilus* защищает от модификации нитроэтилмочевинной фосфаты акцепторного, переменного и Т-стеблей, а также Т-петли.*

Введение. Специфическое узнавание тРНК гомологичными аминокислот-тРНК синтетазами (АРС) является ключевым этапом в процессе трансляции генетической информации. С этим связано наличие огромного количества работ, посвященных исследованию молекулярных механизмов специфического взаимодействия тРНК с АРСазами. Большой интерес исследователей к этой проблеме объясняется также тем, что до недавнего времени структуры тРНК-синтетазных комплексов были единственным источником детальной информации о структурных основах РНК-белкового взаимодействия.

Выбор пары тРНК^{Ser} — серил-тРНК синтетаза в качестве объекта исследования продиктован несколькими причинами. Во-первых, тРНК^{Ser}, тРНК^{Leu} и прокариотические тРНК^{Tyr} отличаются от тРНК других специфичностью наличием длинной переменной ветви, состоящей более чем из 10 нуклеотидов в отличие от обычных 4—5 нуклеотидов. Биохимические данные указывают на то, что длинная переменная ветвь является важным фактором при дискриминации тРНК II структурного класса гомологичными аминокислот-тРНК синтетазами [1, 2]. С другой стороны, тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu}, а также тРНК^{Ala}, относящаяся к тРНК I класса, узнаются гомологичными АРСазами особым кодон-

независимым способом [3—6], в то время как для всех остальных тРНК антикодон является одним из основных элементов узнавания [7, 8]. Кроме того, недавно были получены кристаллы тРНК^{Ser} и серил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus*, диффрактирующие с высоким разрешением, и расшифрована структура комплекса [9, 10]. Полученные результаты указывают на принципиально важную роль рибозофосфатного остова, особенно остатков фосфорной кислоты переменной ветви, тРНК^{Ser} в узнавании ее серил-тРНК синтетазой. Однако при сравнении данных рентгеноструктурного анализа с результатами биохимических исследований взаимодействия тРНК^{Ser} *Escherichia coli* с гомологичной аминокислот-тРНК синтетазой [11] были обнаружены существенные различия в участии переменной ветви в этом процессе. Осталось не выясненным, отражают ли эти отличия существование разных состояний комплекса в растворе и в кристалле либо они свидетельствуют о разных механизмах узнавания тРНК^{Ser}.

Материалы и методы. В работе использовали Т₁-РНКазу (КФ 3.1.27.3, «Sanryo», Япония); щелочную фосфатазу из *E. coli* (КФ 3.1.3.1, «Sigma», США), фосфодиэстеразу змеиного яда (3.1.4.1, «Worthington», США), полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), выделенную из клеток *E. coli*, инфицированных фагом Т4 («Pharmacia», Швеция), тРНК-нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.2.1), любезно

предоставленную д-ром Р. Жьеже (Институт молекулярной и клеточной биологии, Страсбург).

(α -³²P)АТФ, уд. акт. 400 Ки/ммоль, (γ -³²P)АТФ, уд. акт. 3000 Ки/ммоль («Amersham», Англия).

Нитрозозтилмочевина синтезирована А. Г. Терентьевым (Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины).

тРНК^{Ser}₂ получали из суммарного препарата тРНК *T. thermophilus* в несколько ступней, как в работе [12].

Серил-тРНК синтетаза (КФ 6.1.1.11) из *T. thermophilus* 98 % чистоты получена по методу, описанному в работе [13].

тРНК^{Ser}₂, ³²P-меченную по 3'- и 5'-концам, получали, как описано в работах [14] и [15] соответственно.

Алкилирование тРНК^{Ser}₂ (1 мкМ) в присутствии аминоацил-тРНК синтетазы (4 мкМ) проводили в 25 мкл 50 мМ трис-НСI (рН 7,9), содержащего 5 мМ MgCl₂, 2,5 мМ 2-меркаптоэтанол, добавляя 2,5 мкл насыщенного спиртового раствора нитрозозтилмочевины. Реакцию вели в течение 2 ч при 25 °С или 10 мин при 65 °С. Останавливали реакцию добавлением 3 мкл 3 М ацтата натрия, рН 5,5. Аминоацил-тРНК синтетазу удаляли обработкой реакционной смеси водонасыщенным фенолом. тРНК осаждали добавлением 100 мкл дважды перегнанного этанола. Контрольный эксперимент проводили, добавляя вместо нитрозозтилмочевины этанол.

Алкилирование свободной тРНК осуществляли в аналогичных условиях без фенольной экстракции.

Алкилирование тРНК в денатурирующих условиях проводили в 25 мкл 0,3 М натрий-какодилатного буфера, рН 8,0, содержащего 0,1 мМ EDTA, в течение 2 мин при 80 °С.

Полинуклеотидную цепь по модифицированным фосфатам расщепляли (5 мин) в 10 мкл 100 мМ трис-НСI-буфера (рН 9,0) при 55 °С. Фрагменты тРНК осаждали добавлением 3 мкл 3 М ацтата натрия, рН 5,5, и 100 мкл этанола. Полученные образцы расщепленной тРНК анализировали гель-электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 8 М мочевины в 50 мМ трис-боратном буфере, рН 8,3, содержащем 1 мМ EDTA. Электрофоретические полосы идентифицировали, сравнивая их подвижности с таковыми фрагментов тРНК, полученных частичным гидролизом ее рибонуклеазой T₁. Радиоавтографы гелей сканировали на микроденситометре «Joyce Loebel» (Англия).

Трудности, возникающие при осаждении коротких олигонуклеотидов, не позволили получить

информации о реакционной способности фосфатов нуклеотидов 1—3, 70—76.

Результаты и обсуждение. Участки взаимодействия тРНК^{Ser}₂ с серил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus* изучали с помощью алкилирования комплекса нитрозозтилмочевинной по методу Власова [15]. Параллельно исследовали и остатки фосфорной кислоты, участвующие в формировании пространственной структуры тРНК^{Ser}₂. Для этого алкилирование тРНК осуществляли тремя способами: в денатурирующих условиях; в условиях, стабилизирующих третичную структуру молекулы тРНК и в присутствии гомологичной аминоацил-тРНК синтетазы. Для более точного анализа также было проведено несколько экспериментов с разделением меченых олигонуклеотидов в полиакриламидных гелях с концентрациями 10; 12,5 и 20 %. Исследования выполняли как на 3'-, так и на 5'-меченной тРНК. На рис. 1 приведена фотография радиоавтографа одного из таких гелей. Относительные реакционные способности остатков фосфорной кислоты тРНК^{Ser}₂, участвующих в формировании пространственной структуры молекулы, а также находящихся в комплексе с аминоацил-тРНК синтетазой, рассчитывали по денситограммам соответствующих электрофоретических треков (рис. 2).

Из кривой расчета денситограмм следует, что серил-тРНК синтетаза из *T. thermophilus* защищает от модификации нитрозозтилмочевинной 5'-фосфаты нуклеотидов 46—47:с, 47:о, 47:р, 50, 53, 54, 67—69. Как видно, что тРНК^{Ser}₂ взаимодействует с гомологичной аминоацил-тРНК синтетазой со стороны варибельной ветви. Фосфаты антикодонной ветви не имеют контактов с серил-тРНК синтетазой.

Наши данные по исследованию участков взаимодействия тРНК^{Ser}₂ из *T. thermophilus* с гомологичной АРСазой в растворе хорошо согласуются с результатами, полученными при изучении взаимодействия этих молекул в кристалле [9, 10]. В этих работах показано, что с мономером 2 серил-тРНК синтетазы взаимодействуют 5'-фосфаты нуклеотидов 46, 47:с, 47:р, 47:о, 53, 54, 57, 67, а с мономером 1 — фосфаты нуклеотидов 67, 68, 69, 71. В растворе наблюдается несколько большее количество остатков фосфорной кислоты тРНК^{Ser}₂, защищенных от алкилирования нитрозозтилмочевинной в присутствии серил-тРНК синтетазы, чем обнаружено контактов между фосфатами тРНК и белком в кристалле. Отличия наблюдаются в варибельном и Т-стеблях.

Следует отметить, что в кристалле комплекса тРНК^{Ser}₂ с серил-тРНК синтетазой О2' атом нукле-

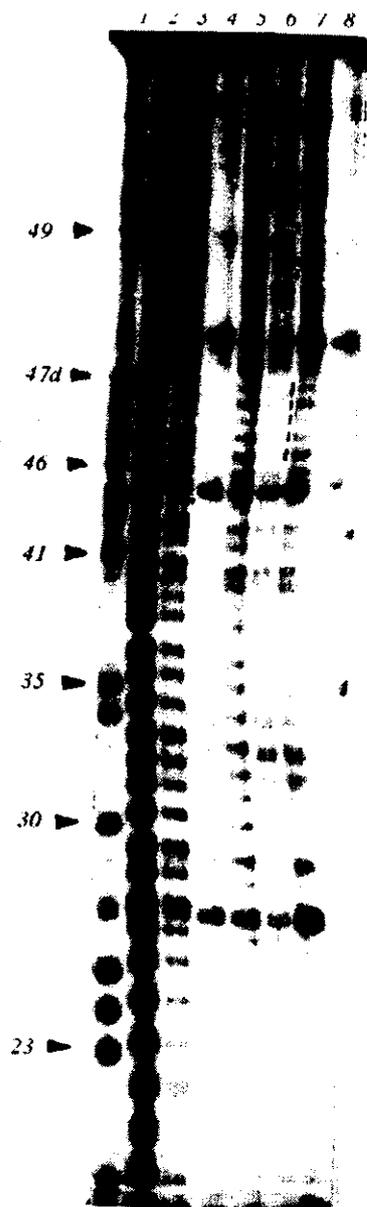


Рис. 1. Авторадиограмма 12,5 %-го полиакриламидного геля, в котором были разделены фрагменты 5'-меченой tRNA₂^{Ser} из *T. thermophilus*, полученные после алкилирования ее нитрозоэтилмочевинной в условиях денатурирующих (2) и стабилизирующих (3, 5) пространственную структуру макромолекулы; в присутствии серил-тРНК синтетазы (6) и гистидил-тРНК синтетазы (7). Контрольные инкубации проводили в условиях стабилизирующих пространственную структуру тРНК (4), и в присутствии серил-тРНК синтетазы (8) в отсутствие нитрозоэтилмочевинной; 1 — тРНК, частично гидролизованная рибонуклеазой T₁. Штриховой линией выделены фосфаты тРНК, защищенные серил-тРНК синтетазой от алкилирования реагентом

отида G47:a и фосфат O2P G47:b приближены к аминокислотным остаткам Lys⁴¹ и Arg⁸ фермента и находятся на расстоянии, лишь немногим превышающем 3,5 Å, что позволяет считать их потенциальными сайтами взаимодействия, осуществляемого при участии молекул воды. Обширная контактная зона тРНК с серил-тРНК синтетазой (нуклеотиды 46—47с), вероятно, создает стерические препятствия для модификации 5'-фосфатов нуклеотидов 47—47b нитрозоэтилмочевинной, атомный радиус молекул которой составляет 2,8 Å [17].

Пространственные затруднения также, возможно, являются причиной низкой реакционной способности 5'-фосфата нуклеотида 50, поскольку из кристаллографических данных известно, что он сближен с рибозой нуклеотида 48 [9].

Количественной информации об активности 5'-фосфата нуклеотида 57 получить не удалось, так как в растворе происходит спонтанный гидролиз фосфодиэфирной связи между нуклеотидами 56 и 57.

Остается открытым вопрос о различиях в участии переменного стебля в процессе узнавания тРНК^{Ser} гомологичной аминокислот-тРНК синтетазой в клетках *E. coli* и *T. thermophilus*.

Результаты наших исследований указывают на то, что взаимодействие тРНК^{Ser} с серил-тРНК синтетазой в растворе и в кристалле происходит аналогичным образом при определяющей роли сахарофосфатного остова переменного стебля. Мы полагаем, что подобный механизм должен реализовываться и в клетках *E. coli*. В пользу этого предположения свидетельствуют следующие факты:

1. Серил-тРНК синтетазы из *E. coli* и *T. thermophilus* имеют очень похожие структуры, особенно в активном центре [18].

2. В перекрестных реакциях осуществляется эффективное аминокислотирование гетерологичной тРНК^{Ser} как серил-тРНК синтетазой из *E. coli*, так и из *T. thermophilus* [9].

3. Вследствие изменений структуры тРНК^{Ser} *E. coli*, вызванных введением мутаций, было показано, что при уменьшении длины переменного стебля до трех пар нуклеотидов аминокислотирование не происходит, что свидетельствует о важной роли данного структурного элемента для процесса узнавания серил-тРНК синтетазой [3].

4. Реакция аминокислотирования полностью угнетена при делеции суперспирального стебля серил-тРНК синтетазы *E. coli* [19]. В серил-тРНК синтетазе из *T. thermophilus* именно этот домен взаимодействует с переменным стеблем тРНК^{Ser} [9, 10].

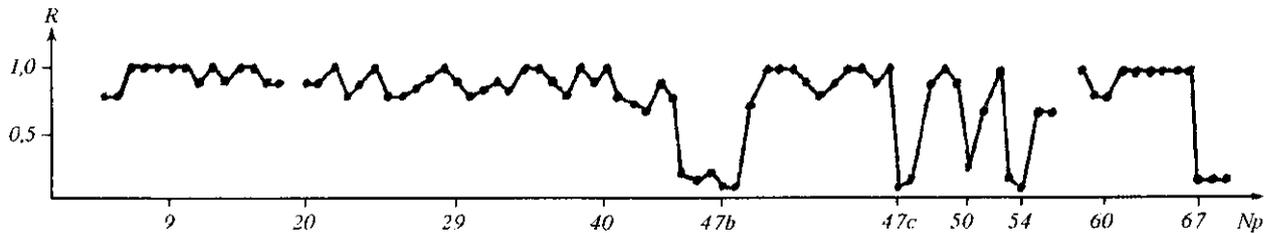


Рис. 2. Относительные реакционные способности остатков фосфорной кислоты tPHK₂^{Ser} из *T. thermophilus*. R — отношения интенсивностей соответствующих электрофоретических полос электрофореграмм экспериментов по алкилированию tPHK в условиях, стабилизирующих пространственную структуру tPHK, и в присутствии серил-tPHK синтетазы. Нуклеотид в положении 18 метилирован по рибозе и потому не вступает в реакцию с нитрозоэтилмочевинной

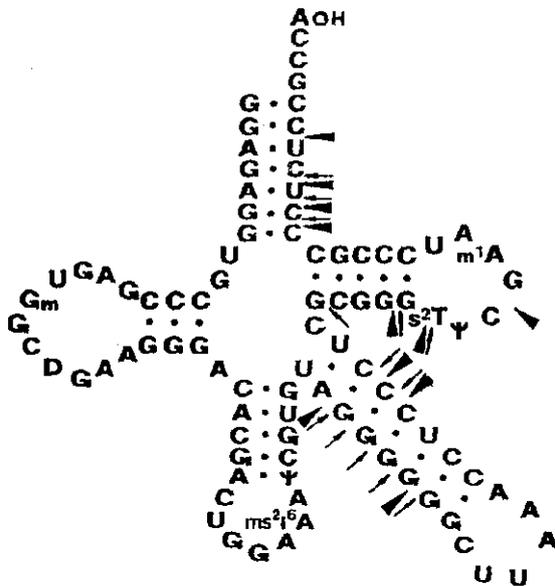


Рис. 3. Структура tPHK₂^{Ser} из *T. thermophilus* в виде клеверного листа. Указаны фосфаты, взаимодействующие с серил-tPHK синтетазой в кристалле комплекса (выделены треугольником) и защищенные серил-tPHK синтетазой от модификации нитрозоэтилмочевинной в растворе (указаны стрелкой)

5. Обнаруженное в комплексе tPHK₂^{Ser} — серил-tPHK синтетазы из *T. thermophilus* нуклеотид-специфическое взаимодействие (пара G_{47a}·C_{47n}) не является критичным для узнавания. При замене

этой пары на A_{47a}·U_{47n} или U_{47a}·U_{47n} происходит эффективное и специфичное аминокислотирование tPHK^{Ser} (Тукало М. А., неопубликованные результаты).

6. В экспериментах по изменению специфичности tPHK^{Tyr} *E. coli* на tPHK^{Ser} были получены мутантные tPHK^{Tyr}, которые эффективно и с высокой степенью специфичности аминокислотировались серином при участии серил-tPHK синтетазы. При этом нуклеотидная последовательность варибельной ветви этих мутантных tPHK^{Tyr} полностью отличалась от таковой для tPHK^{Ser} [1]. Следовательно, узнавание варибельной ветви tPHK^{Ser} *E. coli* серил-tPHK синтетазой не зависит от ее нуклеотидной последовательности.

Поэтому тот факт, что при исследовании участков взаимодействия tPHK^{Ser} *E. coli* с серил-tPHK синтетазой фосфоротиоатным методом не обнаружено контактов с сахарофосфатным остовом варибельного стебля, остается непонятным.

Работа частично финансировалась медицинским институтом Говарда Хьюза (США), грант № 75195—548201.

О. П. Коваленко, З. М. Петрушенко, Н. М. Мальченко, I. А. Крикливий, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Вивчення ділянок взаємодії tPHK₂^{Ser} із *Thermus thermophilus* з серил-tPHK синтетазою методом хімічної модифікації

Резюме

Вивчено реакційну здатність залишків фосфорної кислоти tPHK₂^{Ser} із *T. thermophilus*, що знаходиться у комплексі з серил-tPHK синтетазою. Серил-tPHK синтетаза захищає від модифікації нитрозоетилмочевинною фосфати акцепторного, варибельного, T-стеблів та T-петлі.

O. P. Kovalenko, Z. M. Petruschenko, N. N. Mal'chenko,
I. A. Krikliiviy, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Studies of interaction sites between tRNA^{Ser} from *Thermus thermophilus* and seryl-tRNA synthetase by chemical modification method

Summary

The reaction activity of phosphates of tRNA₂^{Ser} from *T. thermophilus* complexed with its cognate aminoacyl-tRNA synthetase has been defined. Seryl-tRNA synthetase protects phosphates of acceptor, variable, T-stems and T-loop from alkylation by ethylnitrosourea.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Himeno H., Hasegawa T., Ueda T. et al. Conversion of aminoacylation specificity from tRNA^{Tyr} to tRNA^{Ser} in vitro // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 23.—P. 6815—6818.
- Asahara H., Himeno H., Tamura K. et al. 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.
- Asahara H., Himeno H., Tamura K. et al. *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} by its characteristic tertiary structure // Ibid.—1994.—236.—P. 738—748.
- Петрущенко З. М., Тукало М. А., Гудзера О. И. и др. Определение участков взаимодействия тРНК^{Leu} молочной железы коров с гомологичной аминоксил-тРНК синтетазой методом химических модификаций // Биоорг. химия.—1990.—16.—С. 1647—1652.
- Dietrich A., Romby P., Marechal-Drouard L. et al. 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.
- Tamura K., Asahara H., Himeno H. et al. Identity elements of *E. coli* tRNA^{Ala} // J. Mol. Recogn.—1991.—4.—P. 129—132.
- Normanly J., Abelson J. tRNA identity // Annu. Rev. Biochem.—1989.—58.—P. 1029—1049.
- Saks M. E., Sampson J. R., Abelson J. N. The transfer RNA identity problem: a search for rules // Science.—1994.—263.—P. 191—197.
- Biou V., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Ser} // Ibid.—P. 1404—1410.
- Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo 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.
- Schatz D., Leberman R., Eckstein F. Interaction of *Escherichia coli* tRNA^{Ser} with its cognate aminoacyl-tRNA synthetase as determined by footprinting with phosphorothioate-containing tRNA transcripts // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 6132—6136.
- Петрущенко З. М., Коваленко О. П., Мальченко Н. Н. и др. Первичная структура тРНК^{Ser} из *Thermus thermophilus* // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 3.—С. 202—208.
- Яремчук А. Д., Тукало М. А., Коваленко А. В. и др. Выделение серил-тРНК синтетазы из *Thermus thermophilus* HB-27 // Там же.—1989.—5, № 5.—С. 83—86.
- Silberclang M., Gillum A., Rajbhandary U. // Nucl. Acids Res.—1977.—4, N 12.—P. 4091—4108.
- Венкстери Т. В. Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот.—М.: Наука, 1970.—С. 258.
- Vlassov V., Giege R., Ebel T.-P. Tertiary structure of tRNAs in solution monitored by phosphodiester modification with ethylnitrosourea // Eur. J. Biochem.—1981.—119.—P. 51—59.
- 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.
- Fujinaga M., Berthet-Colominas C., Yaremchuk A.D. et al. Refined crystal structure of the seryl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* at 2.5 Å resolution // Ibid.—1993.—234.—P. 222—233.
- Borel F., Vincent C., Leberman R., Hartlein M. Seryl-tRNA synthetase from *E. coli*: implication of its N-terminal domain in aminoacylation activity and specificity // Nucl. Acids Res.—1994.—22.—P. 2963—2969.

УДК 577.217.337.2

Поступила в редакцию 12.06.97