

Виділення і очищення індивідуальної тРНК^{Lys} із *Thermus thermophilus* та визначення її мінорних основ

І. А. Крикливий, О. П. Коваленко, О. Й. Гудзера, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Бул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

mtukalo@imbg.org.ua

*Лізил-тРНК синтетаза разом з аспартил- і аспарагіл-тРНК синтетазами належить до Пб підкласу і має низку характерних особливостей. Всі АРСази Пб підкласу включають N-кінцеві антикодон-зв'язувальні домени (близько 140 амінокислотних залишків), функціонують як гомодимер α_2 і для кожної АРСази антикодоніві триплети гомологічних тРНК є головними, але недостатніми елементами упізнання. При цьому для всіх тРНК, гомологічних АРСазам Пб підкласу, центральною основою антикодону є уридин, і дискримінація цих антикодонів залежить лише від їхньої першої літери. Виникають закономірні запитання щодо структурних основ і механізмів дискримінації цих антикодонів структурно близькими зв'язувальними доменами АРСаз та можливої ролі мінорних основ тРНК у цих процесах. Наведено розроблені методичні підходи до отримання високоочищеної тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* і визначення мінорних основ у її структурі.*

*Ключові слова: тРНК^{Lys}, хроматографія, екстремальний термофіл *Thermus thermophilus*, бензоїльована ДЕАЕ-целюлоза, модифіковані нуклеотиди.*

Вступ. Аміноацилювання тРНК є ключовим етапом експресії генетичної інформації, що забезпечує точний переклад нуклеотидної послідовності ДНК у відповідну послідовність амінокислот білка. Ця реакція каталізується аміноацил-тРНК синтетазами (АРС), які специфічно упізнають гомологічну амінокислоту і тРНК. За сучасною класифікацією [1, 2], лізил-тРНК синтетаза належить до Пб підкласу і на відміну від АРСаз Па підкласу має N-кінцевий антикодон-зв'язувальний домен (близько 140 амінокислотних залишків).

Як показано низкою досліджень [3–7], характерними особливостями аміноацилюючих систем

Пб підкласу (лізинова, аспарагінова і аспарагілова) є те, що різні АРСази дуже близькі за своєю будовою, функціонують у вигляді гомодимеру α_2 і для кожної з них антикодоніві триплети гомологічних тРНК є головними, але недостатніми елементами упізнання.

З іншого боку, всі тРНК, гомологічні зазначеним АРСазам, мають центральною основою антикодону уридин: – тРНК^{Asp} (34-G/QUC, кодони GAU і GAC), тРНК^{Asn} (34-G/QUU, кодони AAU і AAC) і тРНК^{Lys} (34-UUU і 34-CUU, кодони AAA і AAG). Таким чином, дискримінація вищеперелічених антикодонів залежить лише від першої літери антикодону, у зв'язку з чим виникають закономірні питання: які структурні основи і механізми дис-

кримінації цих антикодонів структурно близькими гомологічними зв'язувальними доменами?

Для лізинової системи показано, що присутність модифікованих нуклеозидів у тРНК^{Lys} дуже важлива для упізнання її гомологічною лізил-тРНК синтетазою. Специфічність упізнання немодифікованих транскриптів тРНК^{Lys} знижується у 140–2700 разів [5, 8], але до сьогодні не знайдено зв'язку з конкретною модифікацією. Наприклад, дані щодо кристалічної структури комплексу лізил-тРНК синтетази *T. thermophilus* з тРНК^{Lys} *Escherichia coli* свідчать, що модифікації основ антикодонової петлі U34 і A37 не відбуваються у місцях безпосередніх контактів з ферментом [9]. У той же час встановлено, що для ефективного аміноацилювання тРНК^{Glu} глутамініл-тРНК синтетазою *E. coli* необхідна модифікація mnm5s2U-34 [10]. Відомо також, що модифікації в антикодоновій гілці тРНК^{Lys} мають важливе значення для зв'язування з рибосомами [11–13], для коректного кодон-антикодонового впізнання [14, 15], впливають на швидкість трансляції [16] та є необхідними для ініціації зворотної транскрипції вірусу імунодефіциту людини [17].

Для з'ясування структурної ролі модифікованих нуклеозидів тРНК^{Lys} у зазначених процесах потрібно вивчати комплекси тРНК^{Lys} з відповідними макромолекулами. Таким чином, викладене вище свідчить про те, що виділення індивідуальної тРНК^{Lys} із *T. thermophilus*, у якій присутні природні мінорні нуклеотиди, – є нагальною необхідністю.

Матеріали і методи. Використано такі матеріали: бензоїльована ДЕАЕ-целюлоза (БД-целюлоза) («Serva», ФРН); Сефароза 4В («Pharmacia Fain Chemicals», Швеція); NaCl, MgCl₂ («Fisher», США); трис, сульфат амонію «о. с. ч»; фенілметилсульфонілфторид («Calbiochem», США); ацетат амонію «о. с. ч», 2-меркаптоетанол, дитіотреїтол («Merk», ФРН); фільтри GF/C; діетиламіноетилцелюлоза («Whatman», Англія); ізопропіловий спирт «о. с. ч», ¹⁴C-лізин (300 Кі/моль); ¹⁴C-пролін (239 Кі/моль) («Amersham», Англія). Усі інші реагенти мали кваліфікацію «о. с. ч» і «х. ч». Розчини готували на бідистильованій воді.

Прилади: центрифуга К-70 (ФРН); спектрофотометр «Specord UVVIS» (Німеччина); хроматогра-

фічне обладнання Gold-System та високоефективні хроматографічні колонки Spherogel TSK ДЕАЕ 5PW 21,5 150 мм («Beckman», Японія); Ultrapore RPMS C8 10,0 250 мм («Beckman», США); Ultrapore ODS C18 4,6 250 мм («Beckman», США); сцинтиляційний лічильник Rackbeta («LKB», Швеція).

Виділення і очищення тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* виконували в кілька етапів, які включали отримання сумарних препаратів тРНК із *T. thermophilus*, хроматографію на колонках з БД-целюлозою, оберненофазову хроматографію на Сефарозі 4В і високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) на колонках Spherogel-TSK DE 5PW (21,5 150 мм) і Ultrapore RPMS C8 (10,0 250 мм).

Вирощування клітин *T. thermophilus* штаму НВ-8, одержання сумарної тРНК, хроматографію на колонці з БД-целюлозою і виділення ферменту для тестування тРНК виконували, як описано раніше [18, 19].

Модифіковані нуклеотиди тРНК^{Lys} ідентифікували за допомогою ВЕРХ з використанням колонки Ultrasphere C18 (4,6 250 мм) за методичними рекомендаціями Герке [20]. Для визначення природи модифікованих основ здійснювали повний гідроліз 10–20 мкг тРНК^{Lys} із *T. thermophilus*. Реакційна суміш об'ємом 50 мкл містила: 80 мМ форміат натрію, рН 7,8, 0,5 мМ MgCl₂, 10–20 мкг тРНК, 0,8 мкг РНКазы А, 2,4 мкг фосфомоноестерази кишечника теляти, 2,4 мкг фосфодіестерази зміїної отрути. Гідроліз проводили протягом 18 год за температури 37 °С. Отримані нуклеозиди розділяли на колонці C18 за допомогою HPLC Gold System із одночасним записом спектрів поглинання на сканувальному детекторі 167. Для хроматографії використовували три буферних розчини: А – 10 мМ NH₄H₂PO₄, рН 5,3; 2,5 %-й метанол; Б – 10 мМ NH₄H₂PO₄, рН 5,1; 20 %-й метанол; В – 10 мМ NH₄H₂PO₄, рН 4,9; 35 %-й ацетонітрил. Розчини перед використанням ретельно фільтрували (фільтр 20 мк) і дегазували.

Результати і обговорення. Для хроматографії на колонці з БД-целюлозою (5 60 см) на першому етапі використано 4 г сумарної тРНК. Слід зауважити, що хроматографічні фракції тРНК^{Lys} виходять в області великої оптичної густини (рис. 1) і містять низку тРНК інших специфічностей (лейцинову, пролінову, аланінову та ін.). Найповніше

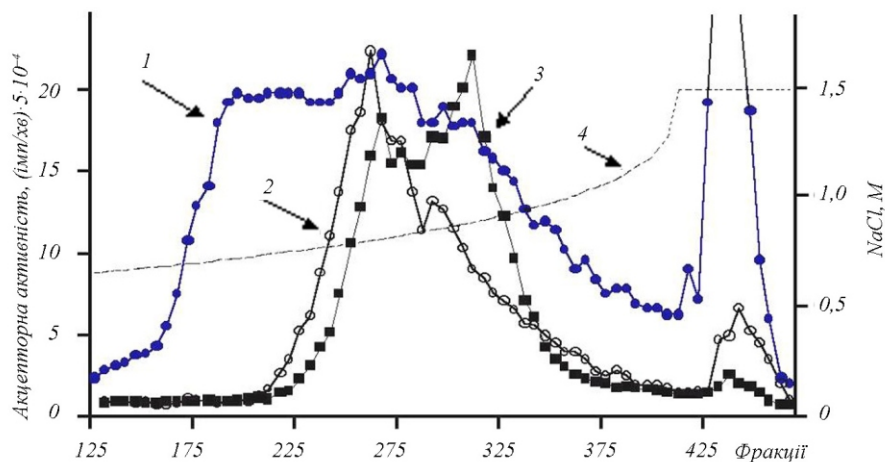


Рис. 1. Хроматографія сумарної тРНК *T. thermophilus* на колонці з бензоїлованою ДЕАЕ-целюлозою: 1 – оптична густина при 260 нм; 2 – включення ¹⁴С-лізину; 3 – включення ¹⁴С-проліну; 4 – концентрація NaCl

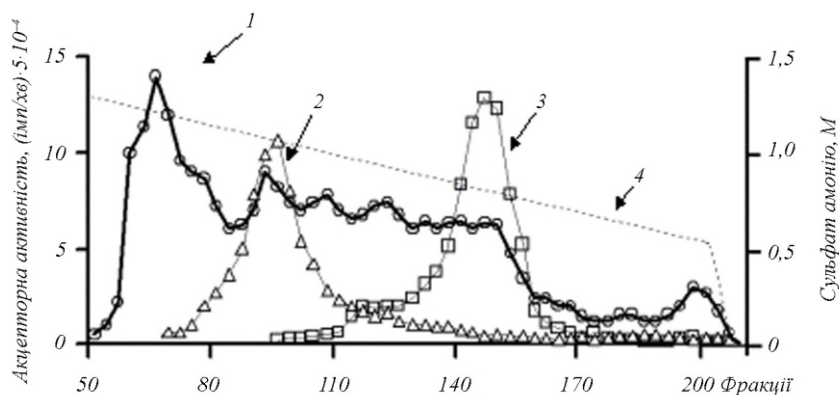


Рис. 2. Очищення тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* на колонці з сефарозою 4В в оберненому градієнті концентрації сульфату амонію: 1 – оптична густина при 260 нм; 2 – включення ¹⁴С-лізину; 3 – включення ¹⁴С-проліну; 4 – градієнт концентрації сульфату амонію

тРНК^{Lys} перекривається з тРНК^{Pro} (фракції 236–350). Спроби виконати подальше очищення тРНК^{Lys} на колонках DE 5PW і C8 (HPLC), як у разі очищення тРНК^{Ser} [19], не мали успіху, тому ми здійснили додаткову стадію очищення – оберненофазову хроматографію на колонці з сефарозою 4В з використанням сульфату амонію. Фізико-хімічним підґрунтям цієї хроматографії є те, що при високій концентрації солі (сульфату амонію) тРНК взаємодіє зі стаціонарною фазою гідрофобними зв'язками, які послаблюються і зникають по мірі зниження концентрації солі.

Висушену тРНК (430 мг) розчиняли у воді і додавали буфер так, щоб тРНК перебувала в розчині, який містив: 0,01 М ацетат натрію (рН 4,5), 0,01 М MgCl₂, 1,6 М сульфат амонію і 6 мМ 2-меркаптоетанол. Цей розчин (30 мл) охолоджували до температури 4 °С і наносили на колонку (2,6 × 70 см), заповнену сефарозою 4В, урівноваженою таким же буфе-

ром і охолодженою до температури 4 °С. Хроматографію тРНК вели оберненим лінійним градієнтом концентрації сульфату амонію (від 1,55 до 0,6 М). Швидкість елювання становила 42 мл/год, об'єм градієнта – 2 × 1,5 л. Відбирали фракції об'ємом 15 мл і досліджували на вміст лізинової і пролінової активностей у реакціях аміноацилювання (рис. 2). Із рис. 2 можна бачити, що тРНК^{Lys} дуже добре відділилася від тРНК^{Pro} і є очищеною від інших тРНК. Недоліком хроматографії на Сефарозі 4В в оберненому градієнті концентрації сульфату амонію є те, що останній перешкоджає прямому осадженню тРНК з розчину додаванням етилового спирту. Тому перед осадженням етанолом фракції 81–106, які містили тРНК^{Lys}, об'єднували, розводили водою у 2–3 рази і наносили на колонку з ДЕАЕ-целюлозою або ДЕАЕ-Toyopearl 650М. Від сульфату амонію колонку відмивали 0,1 М NaCl, а потім тРНК елювали 1 М NaCl.

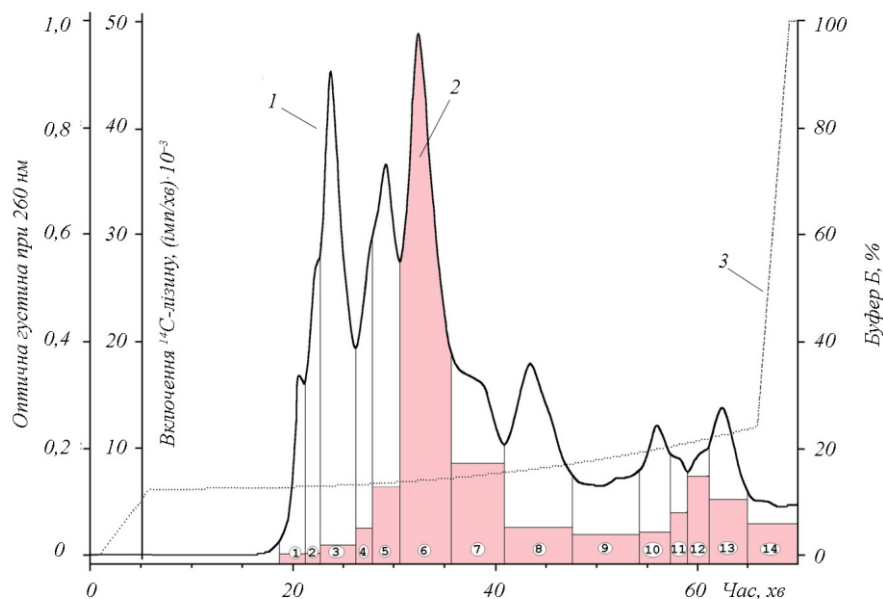


Рис. 3. Очищення тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* на колонці Spherogel TSK ДЕАЕ 5PW: 1 – оптична густина при 260 нм; 2 – включення ¹⁴С-лізину; 3 – градієнт концентрації буфера Б

Подальше очищення тРНК^{Lys} здійснювали на колонках високого тиску за допомогою хроматографа HPLC Gold System.

Хроматографія на колонці *Spherogel-TSK DE 5PW* (21,5 × 150 мм). Хроматографію вели, використовуючи такі буферні розчини: А – 0,05 М трис-Сl, рН 7,5; 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl₂ і 10 %-й 2-ізопропанол; буфер Б відрізнявся вмістом NaCl – 1,0 М.

Висушену тРНК розчиняли у воді і додавали рівний об'єм буфера А. На колонку наносили 15–20 мг тРНК, відмивали буфером А і протягом 5 хв лінійно збільшували долю буфера Б до 17 %, далі елюювали градієнтом концентрації буфера Б, який формували за кривою № 4, запрограмованою у Gold System, збільшуючи вміст буфера Б до 30 % протягом 60 хв. Швидкість елюювання – 5 мл/хв за кімнатної температури (20–25 °С). Профіль елюювання записували при довжині хвилі 280 нм. У процесі хроматографії відбирали фракції, які потім аналізували на вміст тРНК^{Lys}. На рис. 3 подано типову хроматограму, з якої видно, що тРНК^{Lys} виходить з колонки одним піком. Для подальшого виділення індивідуальних тРНК^{Lys} відбирали фракції 6 і 7. Чистота отриманої тРНК^{Lys} складала близько 50 %.

Остаточне очищення тРНК^{Lys} виконували на колонці високого тиску Ultrarogel C8 (1 × 20 см) за допомогою Gold System. Буфер А вміщував 0,05 М ацетат амонію і 0,01 М MgCl₂; буфер Б – 10 %-й

2-ізопропанол. На колонку наносили 4–5 мг тРНК, розчиненої в буфері А. Хроматографію проводили лінійним градієнтом концентрації буфера Б – спочатку протягом 10 хв концентрацію буфера Б підвищували до 3,5 %, а потім – до 9 % упродовж 60 хв. Швидкість елюювання становила 4 мл/хв при кімнатній температурі (20–25 °С). У результаті хроматографії (рис. 4) виділено індивідуальні тРНК₁^{Lys} (фракція 5) і тРНК₂^{Lys} (фракція 7).

Чистоту одержаних препаратів перевіряли електрофорезом інтактних або ³²P-мічених тРНК у 8 %-му ПААГ за присутності 8 М сечовини, а також за рівнем аміноацилювання. Одна оптична одиниця A₂₆₀ (40 мкг) тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* включала 1520 пмоль ¹⁴С-лізину, що відповідає чистоті понад 95 %. Із 4 г сумарної тРНК, нанесеної на першому етапі на колонку з БД-целюлозою, у кінцевому підсумку одержано 7,3 мг тРНК₁^{Lys} і 3,5 мг тРНК₂^{Lys}.

Міnorні нуклеотиди тРНК^{Lys} *T. thermophilus* ідентифікували методом ВЕРХ на колонці Ultrasphere C18 з одночасним записом спектрів поглинання за допомогою сканувального детектора 167 HPLC Gold System. Варто зауважити, що вміст модифікованих основ у складі тРНК дуже низький (один залишок на макромолекулу) порівняно з основними нуклеозидами (А, G, U, C), що утруднює їхню ідентифікацію і вимагає дотримання низки умов хроматографії.

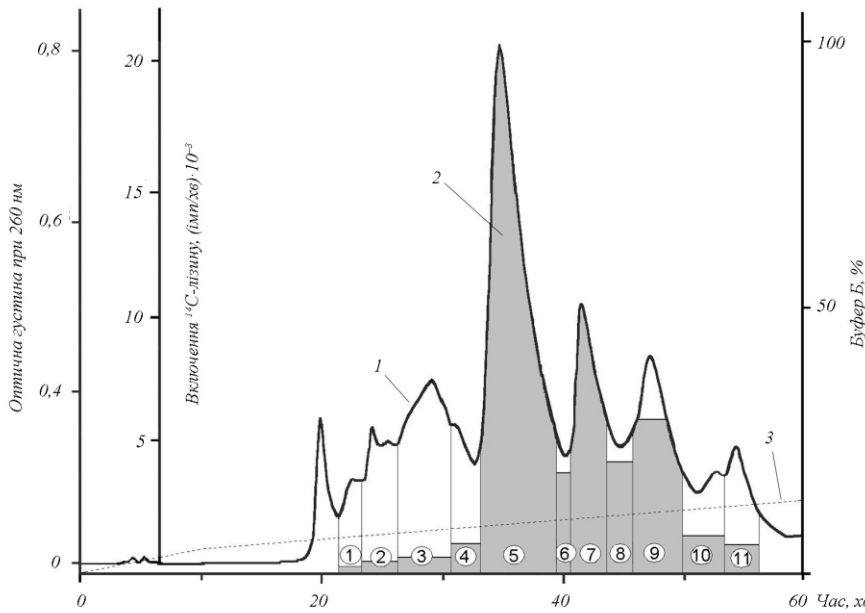


Рис. 4. Очищення тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* на колонці Ultrapore C8: 1 – оптична густина при 260 нм; 2 – включення ¹⁴C-лізину (зафарбована область); 3 – градієнт концентрації буфера Б

Компоненти буферних розчинів повинні мати якомога нижчі молярні коефіцієнти поглинання в ультрафіолетовій ділянці спектра, щоб мінімізувати вплив на базову лінію. Ми використали 10 мМ NH₄H₂PO₄ (молярний коефіцієнт екстинкції 0,01 при 195 нм). Застосування вищих концентрацій цієї солі скорочує термін придатності колонки і насосів. Вищі концентрації інших солей – 0,05–0,2 М (ацетат амонію, форміат амонію) забезпечують отримання більш симетричних піків і відтворюваність часу затримки на колонці основних нуклеотидів, маскуючи активні центри на колонці. Зручність використання цих солей ще й у тому, що можна отримати обезсолені нуклеозиди, висушуючи їх у вакуумі. Зростання величини рН рухливої фази зменшує позитивний заряд основних нуклеотидів і збільшує від’ємний заряд кислих нуклеотидів. Таким чином, основні нуклеозиди стають менш іонізованими і їхній рух на колонці сповільнюється, а кислі нуклеозиди стають іонізованішими і їхній рух прискорюється. Рухливість нейтральних нуклеозидів не змінюється. Незначне зниження рН приводить до протилежного результату. Елюювальна сила ацетонітрилу у 2 рази вища, ніж у метанолу, але (в незначній мірі) відрізняється вибірковістю. Слід зазначити, що при довгому зберіганні ацетонітрилу (більше 3 місяців) утворюються полімери акрилового типу, використання яких може призвести до

пошкодження насосів і кранів. Із даних рис. 5 можна бачити, що, крім чотирьох головних азотистих основ (U, C, G, A), тРНК₁^{Lys} містить у своєму складі мінорні основи Y, m¹A, m⁷G, I, s⁴U, Gm, ms²t⁶A. Для надійнішої ідентифікації модифікованих основ здійснено хроматографію низки чистих мінорних нуклеотидів за таких же умов. Майже всі мінорні нуклеозиди, виявлені в структурі тРНК₁^{Lys}, виходили з колонки в градієнті, створеному буферними розчинами А і Б. Для знімання з колонки ms²t⁶A використовували буферний розчин В.

Спираючись на дані, отримані за допомогою методів швидкого гель-секвенування і визначення природи мінорних нуклеозидів за допомогою ВЕРХ, стало можливим повністю встановити нуклеотидну послідовність тРНК₁^{Lys} із *T. thermophilus*. тРНК₁^{Lys} побудована з 76 нуклеотидних залишків і належить до класу тРНК з коротким варіабельним стеблом (даних не наведено). У складі цієї тРНК виявлено сім модифікованих основ, розташованих в антикодоновій, варіабельній, T- і D-петлях та антикодоновому стеблі. На відміну від тРНК^{Lys} із *E. coli*, структура антикодону якої містить 34-mnm⁵s²U, тРНК₁^{Lys} із *T. thermophilus* має антикодон 34-CUU (рис. 6). Раніше прогнозували, що модифікація основ в антикодоновій петлі відіграє вирішальну роль у формуванні елементів специфічності тРНК^{Lys} із *E. coli* [5]. З іншого боку, вивчення просторових

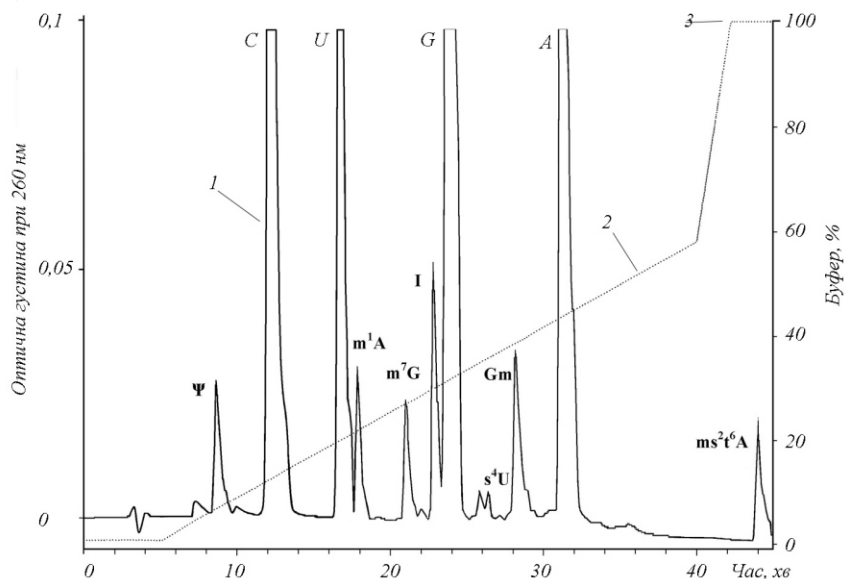


Рис. 5. Розділення нуклеозидів, отриманих в результаті гідролізу тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* на колонці Ultrapore C18: 1 – оптична густина при 260 нм; 2 – частина градієнта, утворена буферами А і Б; 3 – буфер В

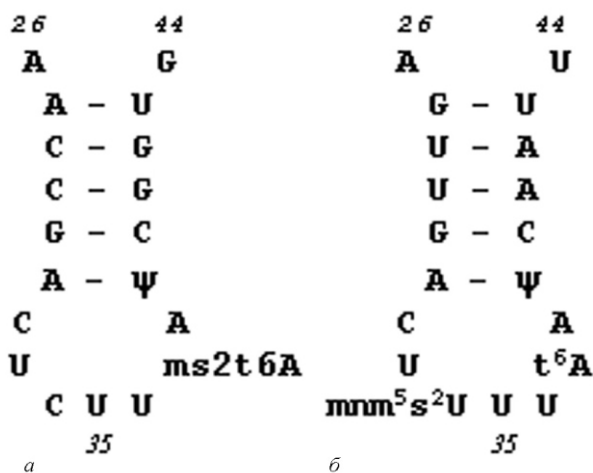


Рис. 6. Порівняння первинних структур антикодонових стебел тРНК^{Lys} із *T. thermophilus* (а) і *E. coli* (б)

структур комплексів лізил-тРНК синтетази *T. thermophilus* з тРНК^{Lys} (mm⁵s²U-34) *E. coli* (0,275 нм) і немодифікованим транскриптом тРНК^{Lys} (34-CUU) із *T. thermophilus* (0,29 нм) показало, що антикодони тРНК^{Lys} *E. coli* і транскрипта знаходяться в ідентичних конформаціях, а модифіковані групи основ 34 і 37 не мають контактів із синтетазою [9]. Більше того, використання варіанту тРНК^{Lys} із *E. coli* без модифікації в U34 виявило, що її відсутність в антикодоновій петлі мало впливає на значення k_{cat}/K_M [21].

Таким чином, можливо, що й інші модифікації нуклеотидів тРНК^{Lys}, які знаходяться за межами антикодону, відіграють важливу роль у специфічності реакції аміноацилювання. Одним із імовірних претендентів на цю роль є 39 в антикодоновому стеблі [8]. Для повної відповіді на поставлене запитання потрібні подальші структурно-функціональні дослідження з використанням як різноманітних транскриптів тРНК^{Lys}, так і нативної тРНК з природними модифікованими основами.

I. A. Krikliiviy, O. P. Kovalenko, O. Y. Gudzera, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Isolation and purification of *Thermus thermophilus* tRNA^{Lys} and determination of its modified nucleotides

Summary

Lysyl-tRNA synthetase along with aspartyl- and asparagyl-tRNA synthetase belong to subclass IIb and have a number of specific features. On the one hand, subclass IIb synthetases have N-terminal anticodon-linking domains (~140 residues), function as homodimers, and anticodon triplets for each ARSase are the main but insufficient identity elements. On the other hand, all tRNA anticodons, corresponding to each synthetase, contain a central U, and discrimination between them often depends on one nucleotide only. Thus, the questions are posed, concerning the structural basis and the mechanisms for discrimination between these anticodons by a homologous binding domain, as well as the possible role of modified bases in this respect. In this paper we described methodological approach to obtaining pure *Thermus thermophilus* tRNA^{Lys} and the determination of modified bases in its structure.

Keywords: мРНК^{Lys}, chromatography, extremal thermophile *Thermus thermophilus*, benzoylated diethylaminoethylcellulose, modified nucleotides.

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

Выделение и очистка индивидуальной tРНК^{Lys} из *Thermus thermophilus* и определение ее минорных оснований

Резюме

Лизил-tРНК синтетаза вместе с аспартил- и аспарагил-tРНК синтетазами принадлежит к IIb подклассу и имеет ряд характерных особенностей. Все APCазы подкласса IIb имеют N-концевые антикодон-связывающие домены (около 140 аминокислотных остатков), функционируют в виде гомодимера, и для каждой APCазы антикодонные триплеты являются главными, но недостаточными элементами узнавания. При этом для всех tРНК, гомологичных этим APCазам, центральным основанием антикодона является уридин, и дискриминация этих антикодонов зависит только от первой буквы антикодона. Возникают закономерные вопросы относительно структурных основ и механизмов дискриминации этих антикодонов структурно близкими связывающими доменами APCаз и возможной роли минорных оснований в этих процессах. Приведены разработанные методические подходы к получению высокоочищенной tРНК^{Lys} из *T. thermophilus* и определению минорных оснований в ее структуре.

Ключевые слова: tРНК^{Lys}, хроматография, экстремальный термофил *Thermus thermophilus*, бензоилированная ДЭАЭ-целлюлоза, модифицированные нуклеотиды.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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**, N 6289.—P. 203–206.
2. 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**, N 6290.—P. 249–255.
3. McClain W. H., Foss K., Jenkins R. A., Schneider J. Nucleotides that determine *Escherichia coli* tRNA^{Arg} and tRNA^{Lys} acceptor identities revealed by analyses of mutant opal and amber suppressor tRNAs // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—**87**.—P. 9260–9264.
4. Pütz J., Puglisi J. D., Florentz C., Geige R. Identity elements for specific aminoacylation of yeast tRNA^{Asp} by cognate aspartyl-tRNA synthetase // Science.—1991.—**252**.—P. 1696–1699.
5. Tamura K., Himeno H., Asahara H., Hasegawa T., Shimizu M. In vitro study of *E. coli* tRNA^{Arg} and tRNA^{Lys} identity elements // Nucl. Acids Res.—1992.—**20**.—P. 2335–2339.
6. Li S., Pelka H., Schulman L. H. The anticodon and discriminator base are important for aminoacylation of *E. coli* tRNA^{Asn} // J. Biol. Chem.—1993.—**268**.—P. 18335–18339.
7. Saks M. E., Sampson J. R., Abelson J. N. The transfer RNA identity problem: a search for rules // Science.—1994.—**263**.—P. 191–197.
8. Fukunaga J.-I., Ohno S., Nishikawa K., Yokogawa T. A base pair at the bottom of the anticodon stem is reciprocally preferred for discrimination of cognate tRNAs by *Escherichia coli* lysyl- and glutaminyl-tRNA synthetases // Nucl. Acids Res.—2006.—**34**, N 10.—P. 3181–3188.

9. Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. The crystal structure of *T. thermophilus* lysyl-tRNA synthetase complexed with *E. coli* tRNA^{Lys} and a *T. thermophilus* tRNA^{Lys} transcript: anticodon recognition and conformational changes upon binding of a lysyl-adenylate analogue // The EMBO J.—1996.—**15**, N 22.—P. 6321–6334.
10. Sylvers L.A., Rogers K.C., Shimizu M., Ohtsuka E., Syll D. A 2-thio-uridine derivative in the tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase // Biochemistry.—1993.—**32**.—P. 3836–3841.
11. Ashraf S., Sochacka E., Cain R., Guenther R., Malkiewicz A. Single atom modification (O-S) of tRNA confers ribosome binding // RNA.—1999.—**5**, N 2.—P. 188–194.
12. Yarian C., Marszalek M., Sochacka E., Malkiewicz A., Guenther R., Miskiewicz A., Agris P. F. Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNA^{Lys} UUU species // Biochemistry.—2000.—**39**.—P. 13390–13395.
13. Marszalek M., Guenther R., Miskiewicz A., Agris P. F. Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides // J. Mol. Biol.—2002.—**277**.—P. 16391–16395.
14. Hagervall T. G., Pomerantz S. C., McCloskey J. A. Reduced misreading of asparagine codons by *Escherichia coli* tRNA^{Lys} with hypomodified derivatives of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine in wobble position // J. Mol. Biol.—1998.—**284**.—P. 33–42.
15. Brierley I., Meredith M., Bloys A. J., Hagervall T. G. Expression of a coronavirus ribosomal frameshift signal in *Escherichia coli*: Influence of tRNA anticodon modification on frameshifting // J. Mol. Biol.—1997.—**270**.—P. 360–373.
16. Kruger M., Pederson S., Hagervall T. The modification of the wobble base of tRNA^{Glu} modulates the translation rate of glutamic acid codons *in vivo* // J. Mol. Biol.—1998.—**284**.—P. 621–631.
17. Isel C., Lanchy J.-M., Le-Grice S. F. G., Ehresman C., Ehresman B., Marquet R. Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase require the post-transcriptional modifications of primer tRNA^{Lys3} // EMBO J.—1996.—**15**.—P. 917–924.
18. Гудзера О. И., Крикливый И. А., Яремчук А. Д., Тукало М. А. Выделение гистидиновой tРНК из *Thermus thermophilus* и изучение ее первичной структуры и участков взаимодействия с гомологичной аминоксил-tРНК синтетазой // Біополімери і клітина.—2006.—**22**, № 3.—С. 201–209.
19. Крикливый И. А., Коваленко О. П., Гудзера О. Й., Яремчук Г. Д., Тукало М. А. Виділення і очищення ізоакцепторних форм tРНК^{Ser} і tРНК^{2Ser} із *Thermus thermophilus* // Біополімери і клітина.—2006.—**22**, № 6.—С. 425–432.
20. Gehrke C., Kuo K. Ribonucleoside analysis by reversed-phase high performance liquid chromatography // J. Chromatogr.—1989.—**471**, N1.—P. 3–36.
21. Commans S., Lazard M., Delort F., Blanquet S., Plateau P. tRNA anticodon recognition and specification within subclass IIb aminoacyl-tRNA synthetases // J. Mol. Biol.—1998.—**278**.—P. 801–813.

УДК 577.217.335
Надійшла до редакції 02.07.07