ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2005. Т. 21. № 5

Дослідження неканонічних комплексів еукаріотного фактора елонгації 1А з тРНК^{Tyr} та тирозил-тРНК синтетазою. Роль окремих доменів синтетази у взаємодії з тРНК

П. В. Футерник, К. Ольжак[1], А. Пшикорська[1], О. І. Корнелюк, Б. С. Негруцький

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
[1]Інститут біохімії і біофізики АН Польщі
Вул. Павінського, 5, Варшава, Польща

E. mail: p.v.futernyk@imbg.org.ua

*Методом аналізу затримки смуги в поліакриламідному гелі делеційних мутантів з'ясовано роль окремих доменів тирозил-тРНК синтетази (TyrRS) у взаємодії з тРНК. Ідентифіковано сайт TyrRS, відповідальний за зв'язування гомологічної тРНК^{Tyr}. Цей сайт формується, в основному, каталітичним модулем TyrRS (TyrRS-ΔC). Проте специфічність зв'язування повнорозмірної TyrRS виявилася суттєво вищою у порівнянні із зв'язуванням тРНК^{Tyr} каталітичним модулем TyrRS-ΔC. Окремий С-модуль також зберігає здатність до зв'язування тРНК^{Tyr}, однак з досить низькою спорідненістю. Отже, припускається можливість залучення цитокінподібного С-модуля TyrRS до зв'язування тРНК у повнорозмірній TyrRS. Досліджено формування неканонічного потрійного комплексу тРНК^{Tyr} з eEF1A*GDP. Ми детектували також формування неканонічного четвертинного комплексу eEF1A*GDP*тРНК^{Tyr}*TyrRS. Найвірогідніше, що основний внесок до цієї взаємодії робить каталітичний домен TyrRS, тому що TyrRS-ΔC також здатна формувати четвертинний комплекс. Ці дані свідчать на користь існування універсального механізму каналювання тРНК, оскільки є вже третім прикладом формування таких незвичних комплексів з різними тРНК.*

Ключові слова: еукаріотний фактор елонгації 1А, тРНК^{Tyr}, тирозил-тРНК синтетаза

Вступ. Біосинтез білка у вищих еукаріотів є складно організованим процесом. Така складність проявляється, між іншим, у високій компартменталізації цього процесу. Власне механізмом, що реалізує потенційні переваги компартменталізації в біосинтезі білка, є каналювання, оскільки відомо, що тРНК у клітині, як правило, перебуває не у вільному стані, а весь час зв'язана з іншими макромолекулярними структурами [1]. Згідно з концепцією каналювання, має місце передача тРНК від Е-сайта рибосоми до аміноацил-тРНК синтетази (ARS) і аміноацил-тРНК від ARS до А-сайта рибосоми без дисоціації у цитоплазму [1, 2]. Вважається, що посередником у передачі тРНК «з рук у руки» в каналюванні тРНК є фактор елонгації 1А (eEF1A) [3].

Нещодавно нами в експериментах *in vitro* виявлено формування неканонічних потрійних комплексів eEF1A*GDP*тРНК^{Phe} і eEF1A*GDP*тРНК^{Ser} [4, 5] та неканонічних четвертинних комплексів eEF1A*GDP*тРНК^{Phe}*фенілаланіл-тРНК синтетаза (PheRS) і eEF1A*GDP*тРНК^{Ser}*серил-тРНК синте-

© П. В. ФУТЕРНИК, К. ОЛЬЖАК, А. ПШИКОРСКА, О. І. КОРНЕЛЮК, Б. С. НЕГРУЦЬКИЙ, 2005

таза (SerRS) [3, 4, 6]. Формування цих комплексів є важливим свідченням на користь запропонованого механізму каналювання тРНК. Проте узагальнення явища каналювання неможливе без істотного розширення спектра досліджуваних специфічностей тРНК і аміноацил-тРНК синтетаз.

У представленій роботі нами вивчено взаємодію eEF1A*GDP з $тРНК^{Tyr}$ і тирозил-тРНК синтетазою (TyrRS). Відомо, що TyrRS (як і PheRS та SerRS) не входить до складу високомолекулярного комплексу ARS, але на відміну від них належить до 1-го структурного класу. Тирозил-тРНК синтетаза ссавців подібно до низки інших еукаріотних аміноацил-тРНК синтетаз містить додатковий некаталітичний С-кінцевий домен [7—8]. Нещодавно показано гомологію некаталітичного С-кінцевого домену та нового цитокіну EMAP II [9—10], а також продемонстровано EMAP II-подібні активності рекомбінантного некаталітичного С домену [11, 12]. TyrRS є дуже цікавим об'єктом для дослідження ще й з тієї причини, що побудовано модель її просторової структури та здійснено кристалографічні дослідження [13—16]. Крім того, для TyrRS ссавців створено рекомбінантні делеційні мутанти, що дає змогу дослідити роль С-кінцевого некаталітичного домену у зв'язуванні тРНК та визначити його можливу роль у формуванні комплексу з eEF1A [17].

Роль N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS цілком відома — це аміноацилювання гомологічної тРНК. Проте значення С-кінцевого домену залишається не до кінця зрозумілим. Припускається, що він виконує додаткову функцію зв'язування тРНК у складі повного ферменту, а цитокінову активність проявляє лише після протеолітичного відщеплення від каталітичного модуля синтетази.

Методом затримки смуги в поліакриламідному гелі (ПААГ) проаналізовано спорідненість різних делеційних мутантів еукаріотної TyrRS до гомологічної $тРНК^{Tyr}$. Визначено, що спорідненість до тРНК С-кінцевого домену вимагає наявності обох субдоменів (А і В) і підсилюється за присутності частини каталітичного домену. Встановлено також можливість формування неканонічного потрійного комплексу eEF1A*GDP*$тРНК^{Tyr}$, а також виявлено утворення неканонічного четвертинного комплексу eEF1A*GDP*$тРНК^{Tyr}$*TyrRS.

Матеріали і методи. ATP, GDP, CTP, N,N-метиленбісакриламід, трис, HEPES, додецилсульфат Na (SDS) («Calbiochem», США); β-меркаптоетанол, гліцерин, NH_4Cl, $MgCl_2$ («Merck», Німеччина); акриламід (двічі перекристалізований), TEMED, PMSF, DTT, EDTA («Serva», Німеччина), фільтри GF/C («Whatman», Великобританія), персульфат натрію, кумасі R-250 («Bio-Rad», США); сцинтиляційна рідина OptiPhase «HiSafe» («Sed», Великобританія), фосфодіестераза зміїної отрути (PDE I Type IV із *Crotalus athrox* venom («Sigma», США), [α-^{32}P]ATP, [γ-^{32}P]ATP, [U-^{14}C]L-тирозин («Amersham», Англія).

Решту реактивів маркіровано як «х. ч.» або «ос. ч».

Препарати сумарної тРНК з печінки бика отримували, використовуючи пряму депротеїнізацію гомогенату тканини фенолом з наступною хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі [18]. Препарати $тРНК^{Tyr}$ отримано із сумарної тРНК печінки бика за схемою, що включала хроматографію на BD-целюлозі та в системі HPLC Gold на колонках Spherogel-TSK DEAE 5PW, C3 RPSC 5u Ultrapore та Hypersil 5C4 («Beckman», США). В одних випадках препарати $тРНК^{Tyr}$ мітили по 3'-кінцю [α-^{32}P]ATP за допомогою нуклеотидил-тРНК трансферази дріжджів [19], в інших — [γ-^{32}P]ATP по 5'-кінцю нуклеотидкіназою [20].

Препарат eEF1A з печінки кроля, ізольований, як описано в [4], люб'язно наданий Т. В. Будкевич і А. П. Погрібною.

Препарати повнорозмірної TyrRS та делеційних мутантів отримано з використанням плазмідних векторів для бактеріальної експресії *pET32a* і експресовано в *Ecsherichia coli* BL21DE3. Вважається, що додаткові частини в складі рекомбінантних білків незначною мірою впливають на їхні властивості.

Ми використовували такі конструкції (рис. 1): 1) TyrRS — повнорозмірна TyrRS ссавців; 2) TyrRS-ΔC — N-кінцевий каталітичний домен; 3) YCD2 — С-кінцевий домен + частина каталітичного домену (Asp322-Lys348); 4) YCD3 — С-кінцевий домен TyrRS ссавців; 5) YCD4 — OB-fold С-кінцевого домену (В-субдомен); 6) YCD5 — А-субдомен С-кінцевого домену.

Формування комплексів досліджували методом затримки смуги в ПААГ. Білки, нуклеотиди та радіоактивно мічену тРНК інкубували в 10 мкл суміші, що містила 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ ДТТ та 10 %-й гліцерин. Інкубацію проводили протягом 15 хв при температурі 37 °С, після чого наносили на 5 %-й ПААГ

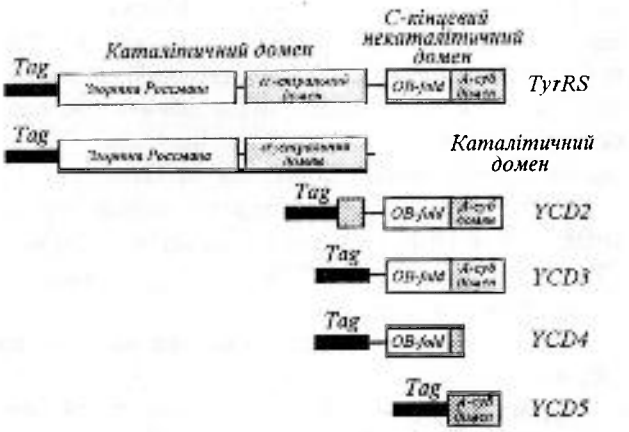

Рис. 1. Будова рекомбінантних делеційних мутантів TyrRS

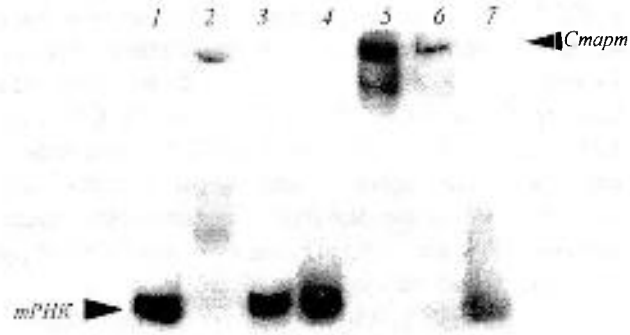

Рис. 2. Формування комплексів рекомбінантних білків з тРНК. Радіоавтографія електрофорезу в поліакриламідному гелі в неденатурувальних умовах (2 год): *1* — вільна $[^{32}P]$тРНК^{Tyr}; *2* — $[^{32}P]$тРНК^{Tyr} + YCD2 (2 мкМ); *3* — $[^{32}P]$тРНК^{Tyr} + YCD4 (2 мкМ); *4* — $[^{32}P]$тРНК^{Tyr} + YCD5 (2 мкМ); *5* — $[^{32}P]$-тРНК^{Tyr} + TyrRS (0,5 мкМ); *6* — $[^{32}P]$тРНК^{Tyr} + TyrRS-ΔC (0,5 мкМ); *7* — $[^{32}P]$тРНК^{Tyr} + YCD3 (2 мкМ)

(без денатурувальних агентів, співвідношення акриламід/N,N-метиленбісакриламід — 39/1), який готували в 25 мМ трис-боратному буфері, pH 7,5, що містив 0,5 мМ ЕДТА і 5 %-й гліцерин. Електрофорез здійснювали у пластинах ПААГ розміром (0,1 × 10 × 7,5 см) протягом 2 год при температурі 4 °С та напрузі 100 В. Електродний буфер використовували такий же, як і в гелі. Гель радіоавтографували, експонуючи його упродовж 12 год при кімнатній температурі на радіоавтографічних пластинах з проявленням на Phosphoimager Storm™ («Molecular Dynamics», США) з розділенням 50 мкм.

Результати і обговорення. *Визначення сайта TyrRS, відповідального за зв'язування mPHK.* Для визначення сайта взаємодії тРНК^{Tyr} з TyrRS ссавців із застосуванням методу затримки смуги в ПААГ ми аналізували спорідненість $[^{32}P]$тРНК^{Tyr} до різних доменів TyrRS. Як видно з рис. 2, повнорозмірна TyrRS та TyrRS-ΔC взаємодіють з $[^{32}P]$тРНК^{Tyr} при концентрації приблизно 0,5 мкМ (доріжки *5* і *6*).

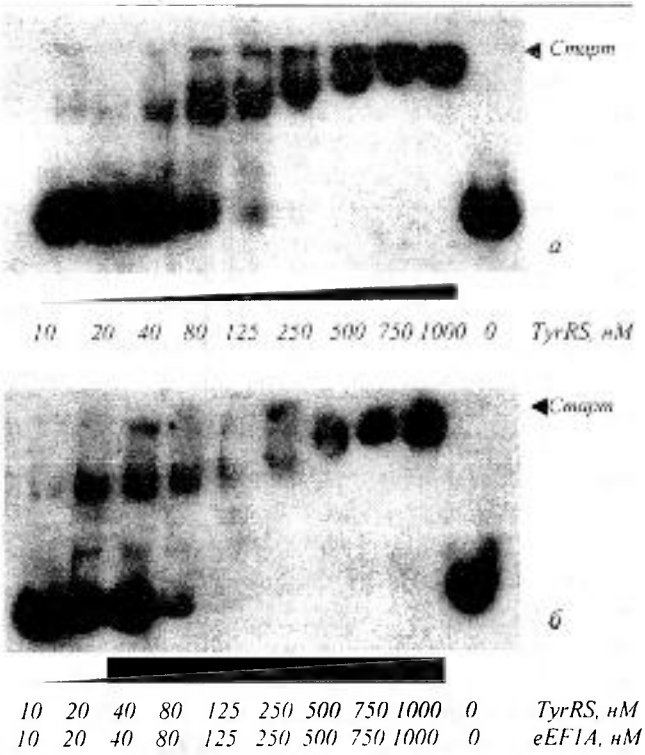

Рис. 3. Формування комплексів $[^{32}P]$тРНК^{Tyr}*TyrRS (*а*) та eEF1A*GDP*$[^{32}P]$тРНК^{Tyr}*TyrRS (*б*). Радіоавтографія електрофорезу в 5 %-му ПААГ у неденатурувальних умовах

Встановлено, що лише повні форми С-кінцевого домену (YCD2 і YCD3) здатні формувати комплекси з тРНК при 2 мкМ концентраціях (доріжки *2* і *7*). Окремі субдомени С-модуля синтетази, які мають делеції амінокислотної послідовності з С- або N-кінця (YCD4 та YCD5), не зв'язують тРНК навіть при вищезазначених концентраціях (доріжки *3* і *4*). Слід відмітити, що через позитивний заряд YCD2 і YCD3 можуть рухатися за наших умов експерименту у зворотному напрямку або залишатися на старті, тому формування комплексів з тРНК реєстрували по зменшенню вмісту вільної тРНК в гелі.

На основі отриманих даних оцінювали спорідненість тРНК^{Tyr} до різних форм TyrRS. Визначено, що уявна K_d для повнорозмірної TyrRS складає приблизно 100 нМ (рис. 3, *а*), а для TyrRS-ΔC — приблизно 500 нМ (рис. 4, *а*). Ці дані добре

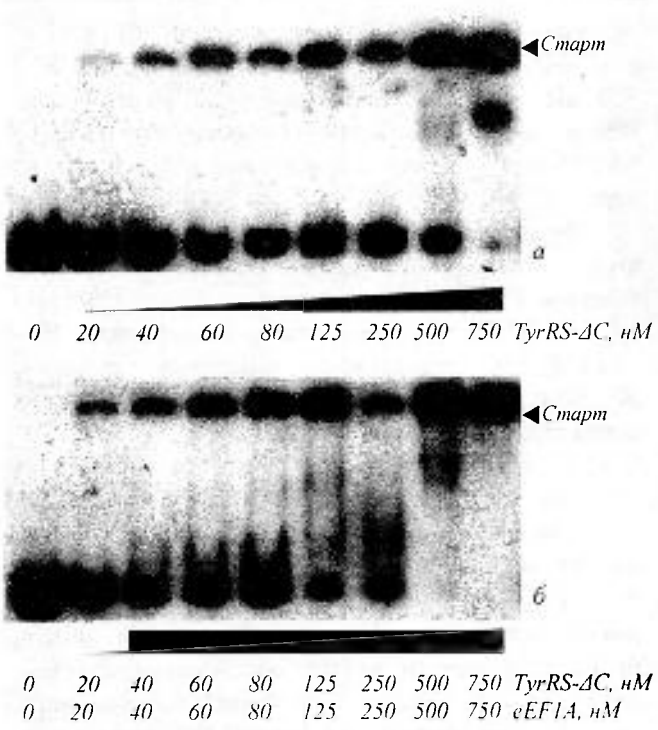

Рис. 4. Формування комплексів [^{32}P]тРНК^{Tyr}*TyrRS-ΔC (*а*) та eEF1A*GDP*[^{32}P]тРНК*TyrRS-ΔC (*б*). Радіоавтографія електрофорезу в 5 %-му ПААГ у неденатурувальних умовах

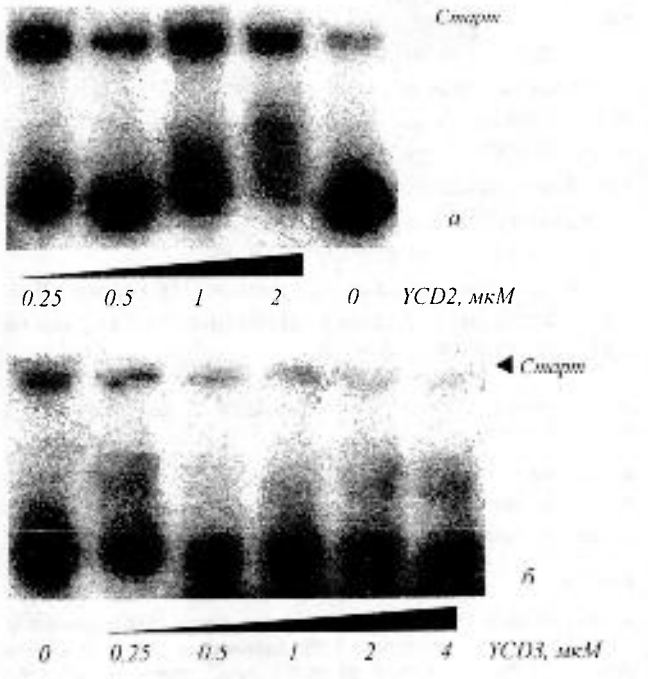

Рис. 5. Концентраційна залежність формування комплексів YCD2 і YCD3 з [^{32}P]тРНК^{Tyr}. Дані радіоавтографії після електрофорезу в 5 %-му ПААГ

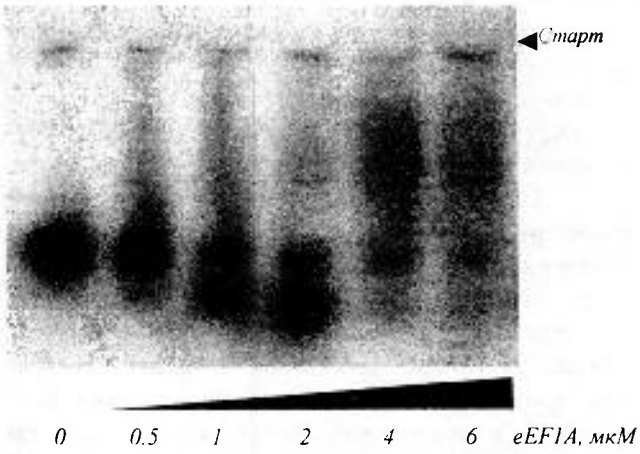

Рис. 6. Формування комплексу eEF1A*GDP*[^{32}P]тРНК^{Tyr}. Радіоавтографія електрофорезу в 5 %-му ПААГ у неденатурувальних умовах

корелюють з величинами каталітичних характеристик для двох форм тирозил-тРНК синтетази, отриманих раніше [21]. Слід відзначити, що окремий С-модуль також може зв'язувати тРНК: для YCD2 та YCD3 уявна K_d складає відповідно 1 мкМ та > 4 мкМ (рис. 5, *а*, *б*). Отже, за спорідненістю до гомологічної тирозинової тРНК усі досліджені білки можна розташувати таким чином: TyrRS > > TyrRS-ΔC > YCD2 > YCD3.

*Формування неканонічного потрійного комплексу eEF1A*GDP*[^{32}P]mPHK^{Tyr}.* Методом затримки смуги в ПААГ визначено, що комплекс eEF1A*GDP з тРНК^{Tyr} формується, але він є не дуже стабільним (K_d приблизно 1—2 мкМ) (рис. 6). На відміну від описаних вище експериментів у гелі не відмічено чіткої смуги, яка відповідає комплексу білка з тРНК. Високий позитивний заряд молекули (pI = 9,1), напевно, не дозволяє як білку, так і комплексу з [^{32}P]тРНК^{Tyr} увійти до гелю в зазначених умовах. Тому формування комплексу детектували за зменшенням вмісту вільної [^{32}P]тРНК^{Tyr} у гелі.

*Формування неканонічного четвертинного комплексу eEF1A*GDP*mPHK^{Tyr}*TyrRS.* Проводили інкубацію eEF1A*GDP з [^{32}P]тРНК^{Tyr} та TyrRS і оцінювали стабільність комплексів методом затримки смуги в ПААГ. Визначено, що уявна K_d четвертинного комплексу складає приблизно 50—60 нМ (рис. 3, *б*), тоді як K_d комплексу тРНК^{Tyr} з TyrRS становить 80—100 нМ (рис. 3, *а*).

Таким чином, зафіксовано різницю в спорідненості TyrRS до тРНК за присутності eEF1A, тобто виявлено формування четвертинного комплексу eEF1A*GDP*[^{32}P]тРНК^{Tyr}*TyrRS. Показано мож-

ливість формування неканонічного четвертинного комплексу eEF1A*GDP*[^{32}P]тРНК^{Tyr}*TyrRS-ΔC.

Спорідненість комплексу [^{32}P]тРНК^{Tyr}*TyrRS-ΔC (K_d = 500 нМ) значно менша за таку повнорозмірної TyrRS з тРНК^{Tyr} (K_d = 50—60 нМ) (рис. 4, *а*). Слід зазначити, що, незважаючи на це, міні-форма синтетази TyrRS-ΔC здатна формувати стабільний четвертинний комплекс (K_d ~100 нМ), як це показано на рис. 4, *б*.

Отримані результати дозволили ідентифікувати сайт TyrRS, відповідальний за зв'язування гомологічної тРНК^{Tyr}. Очевидно, що цей сайт формується, в основному, каталітичним модулем TyrRS (TyrRS-ΔC), який складається, як відомо, з нуклеотидзв'язувальної згортки Россмана та α-спірального домену, відповідального за зв'язування антикодону тРНК. Проте специфічність зв'язування повнорозмірної TyrRS (100 нМ) є суттєво вищою порівняно із зв'язуванням тРНК^{Tyr} каталітичним модулем TyrRS-ΔC (500 нМ). Отже, можна припустити вірогідність залучення цитокінподібного С-модуля TyrRS до зв'язування тРНК у повнорозмірній TyrRS. Таке може відбуватися за рахунок формування додаткових зв'язків між С-модулем та нуклеотидами антикодону тРНК (окрім антикодон-зв'язувального домену) та суттєвого підсилення специфічності зв'язування тРНК. Подібну модель недавно запропоновано в роботі [22] для комплексу тРНК^{Tyr} та TyrRS з *Thermus thermophilus*.

Цікаво, що окремий С-модуль також зберігає здатність до зв'язування тРНК^{Tyr}, проте з досить низькою спорідненістю. Очевидно, що цей ефект обумовлений наявністю в ізольованого С-модуля неспецифічної тРНК-звязувальної активності. Остання, як відомо, є основною функцією цього білка як у про- [23], так і в еукаріотів [24—26]. Нами отримано попередні дані щодо можливості зв'язування ізольованим С-модулем негомологічної тРНК^{Phe}, причому це зв'язування є структуро-специфічним і зберігається лише для нативної просторової структури тРНК [27].

Формування неканонічного потрійного комплексу тРНК^{Tyr} з eEF1A*GDP свідчить на користь існування універсального механізму каналювання тРНК, оскільки цей комплекс є вже третім прикладом формування таких незвичних комплексів з різними тРНК. Відносно невелика спорідненість eEF1A до тРНК^{Tyr} цілком логічно пояснюється відмінностями у будові різних тРНК. Наприклад, значення K_d для потрійних комплексів eEF1A*GDP з тРНК^{Phe} та тРНК^{Ser} складають відповідно 20 і 500 нМ, тобто відрізняються у 25 разів [4, 5]. Відомо, що K_d для канонічних комплексів eEF1A *GTP*аа-тРНК також відрізняються більш ніж на порядок [28].

Ми детектували також формування неканонічного четвертинного eEF1A*GDP*тРНК^{Tyr}*TyrRS комплексу. Якщо порівняти уявну K_d для комплексу TyrRS*тРНК^{Tyr} (яка складає приблизно 80—100 нМ) з K_d четвертинного комплексу (приблизно 50—60 нМ) і врахувати, що eEF1A*GDP за таких концентрацій взагалі не взаємодіє з тРНК (K_d ~ 1 мкМ), то можна зробити висновок про те, що четвертинний eEF1A*GDP*тРНК^{Tyr}*TyrRS комплекс дійсно утворюється. Найвірогідніше, що основний внесок до цієї взаємодії робить каталітичний домен TyrRS, оскільки TyrRS-ΔC також здатна формувати четвертинний комплекс (рис. 4, *б*). Варто зазначити, що про можливість формування комплексу TyrRS з фактором елонгації йшла мова в нашій попередній роботі [29] при дослідженні високомолекулярного лабільного комплексу TyrRS у безрибосомному тканинному екстракті печінки бика. В такому комплексі TyrRS вирізняється підвищеною стабільністю до термоінактивації.

Цікаво, що, згідно з попередніми даними, експресований окремо С-кінцевий домен TyrRS також здатний взаємодіяти одночасно з тРНК та eEF1A*GDP. Формування подібного комплексу є ще одним доказом на користь існування механізму передачі тРНК від рибосоми до ARS шляхом каналювання за участі eEF1A*GDP.

Роботу виконано за підтримки Державного Фонду Фундаментальних Досліджень (проекти 05.07.00002 і 05.07.00003).

P. V. Futernyk, K. Olszak, A. Przykorska, A. I. Kornelyuk, B. S. Negrutskii

Investigation of non-canonical complexes of eukaryotic elongation factor 1A with tRNA^{Tyr} and tyrosyl-tRNA synthetase. Role of different domains of the synthetase in interaction with tRNA

Summary

A role of different domains of bovine tyrosil-tRNA synthetase (TyrRS) in the interaction with homologous tRNA has been determined by the method of tRNA band retardation in polyacrylamide gel. The site of TyrRS responsible for the binding of tRNA^{Tyr} is found to be formed mostly by the catalytic domain of TyrRS (TyrRS-ΔC). At the same time, the full-length TyrRS is found to bind tRNA stronger than TyrRS-ΔC. Cytokine-like C-

*domain of TyrRS also has tRNA-binding properties but much weaker than TyrRS-ΔC suggesting its possible involvement in tRNA binding as well. The formation of non-canonical ternary complex of $tRNA^{Tyr}$ and eEF1A*GDP has been shown. Also, the formation of quaternary complex of eEF1A*GDP*$tRNA^{Tyr}$*TyrRS is detected. The catalytic domain of TyrRS appears to be responsible for this interaction, because the TyrRS-ΔC also is found to form the complex with eEF1A*GDP*$tRNA^{Tyr}$. These data support the universality of the tRNA channeling mechanism.*

Key words: eukaryotic elongation factor 1A, $tRNA^{Tyr}$, tyrosyl-tRNA synthetase.

П. В. Футерник, К. Ольжак, А. Пшикорская, А. И. Корнелюк, Б. С. Негруцкий

Исследование неканонических комплексов эукариотного фактора элонгации 1А с $тРНК^{Тир}$ и тирозил-тРНК синтетазой. Роль отдельных доменов синтетазы во взаимодействии с тРНК

Резюме

*Методом анализа задержки полосы в полиакриламидном геле делеционных мутантов определена роль отдельных доменов тирозил-тРНК синтетазы (TyrRS) во взаимодействии с тРНК. Определен сайт TyrRS, ответственный за связывание гомологичной $тРНК^{Tyr}$, формирующийся, в основном, каталитическим модулем TyrRS (TyrRS-ΔC). Тем не менее, сродство к тРНК полноразмерной TyrRS оказалось выше, чем каталитического модуля TyrRS-ΔC. Отдельный С-модуль также сохраняет способность к связыванию $тРНК^{Tyr}$, но с достаточно низким сродством, что предполагает возможность вовлечения и цитокиноподобного С-модуля TyrRS в связывание тРНК в полноразмерной TyrRS. Показано формирование неканонического тройного комплекса $тРНК^{Tyr}$ с eEF1A*GDP. Мы детектировали также формирование неканонического четвертичного комплекса eEF1A*GDP*$тРНК^{Tyr}$*TyrRS. Наиболее вероятно, что основной вклад в это взаимодействие вносит каталитический домен TyrRS, поскольку TyrRS-ΔC также способна формировать четвертичный комплекс. Эти данные свидетельствуют в пользу существования универсального механизма ченнелинга тРНК.*

Ключевые слова: эукариотный фактор элонгации 1А, $тРНК^{Tyr}$, тирозил-тРНК синтетаза.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Negrutskii B. S., Deutscher M. P.* Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 4991—4995.
2. *Negrutskii B. S., El'skaya A. V.* Eukaryotic translation elongation factor 1A: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.—1998.—60.—P. 48—77.
3. *Negrutskii B. S., Budkevich T. V., Shalak V. F., Turkovskaya G. V., Els'skaya A. V.* Rabbit translation elongation factor 1α stimulates the activity of homologous aminoacyl-tRNA synthetase // FEBS Lett.—1996.—382.—P. 18—20.
4. *Petrushenko Z. M., Negrutskii B. S., Ladokhin A. S., Budkevich T. V., Shalak V. F., El'skaya A. V.* Evidence for the formation of an unusual ternary complex of rabbit liver EF-1α with GDP and deacylated tRNA // FEBS Lett.—1997.—407.—P. 13—17.
5. *Футерник П. В., Погрібна А. П., Петрушенко З. М., Негруцький Б. С., Єльська Г. В.* Дослідження комплексів фактора елонгації 1А з $тРНК^{Сер}$ та серил-тРНК синтетазою // Біополімери і клітина.—2004.—20, № 1—2.—С. 17—23.
6. *Petrushenko Z. M., Budkevich T. V., Shalak V. F., Negrutskii B. S., El'skaya A. V.* Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1A*GDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. Implications for tRNA channeling // Eur. J. Biochem.—2002.—269.—P. 4811—4818.
7. *Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х., Корнелюк А. И.* Клонирование кДНК кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с использованием ПЦР-амплифицированного радиоактивно меченного гибридизационного зонда // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 2.—С. 121—126.
8. *Mirande M.* Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications // Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.—1991.—40.—P. 95—141.
9. *Kleeman T. A., Wei D. B., Simpson K. L., First E. A.* Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine // J. Biol. Chem.—1997.—272.—P. 14420—14425.
10. *Леванец О. В., Найденов В. Г., Одынец К. А., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х., Корнелюк А. И.* Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином EMAP II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 6.—С. 474—478.
11. *Kornelyuk A., Tas M. P. R., Dubrovsky A. L., Murray C. J.* Cytokine activity of non-catalityc EMAP-2-like domain of mammalian tyrosil-tRNA synthetase // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 2.—P. 168—172.
12. *Wakasugi K., Schimmel P. T.* Two distinct cytokine released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // Science.—1999.—284.—P. 147—151.
13. *Golub A. G., Odynets K. A., Nyporko A. Yu., Kornelyuk A. I.* 3D structure modeling of the COOH-terminal cytokine-like module of the mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase // Біополімери і клітина.—2000.—16, № 6.—P. 515—524.
14. *Одинець К. О., Базилевський О. Є., Корнелюк О. І.* Моделювання просторової структури NH_2-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази з *Bos taurus* // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 6.—С. 547—550.
15. *Yang X. L., Skene R. J., McRee D. E., Schimmel P.* Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2002.—99, N 243.—P. 15369—15374.
16. *Yang X. L., Liu J., Skene R. J., McRee D. E., Schimmel P.* Crystal structure of an EMAP-II-like cytokine released from a human tRNA synthetase // Helv. Chim. Acta.—2003.—86.—P. 1246—1257.
17. *Дубровский А. Л., Браун Дж., Корнелюк А. И., Мюррей Дж. К., Мацука Г. Х.* Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина EMAP-2 и цитокинподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 3.—С. 229—235.
18. *Brungraber E. F.* A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1962.—8.—P. 1—3.
19. *Silberclang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L.* Use of *in vitro* ^{32}P labeling in the sequence analysis of nonradioactive tRNAs // Meth. Enzymol.—1979.—59.—P. 58—109.

20. *Keith G., Pixa G., Fix C., Dirheimer G.* Primary structure of three tRNAs from brewers yeast: $tRNA_2^{Pro}$, $tRNA_1^{His}$ and $tRNA_2^{His}$ // Biochimie.—1983.—**65**.—C. 661—672.
21. *Kornelyuk A. I., Kurochkin I. V., Matsuka G. Kh.* Bovine liver tyrosyl-tRNA synthetase. Isolation and physicochemical properties. // Mol. Biol. (Moscow).—1988.—**22**, N 1.—P. 176—186.
22. *Yaremchuk A., Kriklivyi I., Tukalo M., Cusack S.* Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition // EMBO J.—2002.—**21**.—P. 3829—3840.
23. *Swairjo M. A., Morales A. J., Wang C. C., Ortiz A. R., Shimmel P.* Crystal structure of trbp111: a structure specific tRNA binding protein // EMBO J.—2000.—**19**.—P. 6287—6298.
24. *Simos G., Segref A., Fasiolo F., Hellmuth K., Shevchenko A., Mann M., Hurt E. C.* The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases // EMBO J.—1996.—**15**.—P. 5437—5448.
25. *Kim Y., Shin J., Li R., Cheong C., Kim K., Kim S.* A novel anti-tumor cytokine contains a RNA-binding motif present in amynoacyl-tRNA synthetases // J. Biol. Chem.—2000.—275.—P. 27062—27068.
26. *Shalak V., Kaminska M., Mitnacht-Kraus R., Vandenabelle P., Clauss M., Mirande M.* The EMAPII cytokine released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component // J. Biol. Chem.—2001.—276, N 26.—P. 23769—23776.
27. *Golub A., Petrushenko Z., Odynets K., Dubrovsky A., Rozhko O., Matsuka G., Solecka K., Olszak K., Przykorska A., Kornelyuk A.* Cytokine-like C-terminal module of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase reveals structure-specific tRNA binding: Computational docking modeling and footprint analysis // Aminoacyl-tRNA synthetases in biology, medicine, and evolution.—Asilomar, 2002.—P. 116.
28. *Dreher T. W., Uhlenbeck O. C., Browing K. S.* Quantative assessment of EF-1alpha. GTP binding to aminoacyl-tRNAs, aminoacyl-viral RNA and tRNA shows close correspondence to the RNA binding properties of EF-Tu // J. Biol. Chem.—1999.—**274**.—P. 666—672.
29. *Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х.* Высокомолекулярный лабильный комплекс тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Биополимеры и клетка.—1991.—7, № 1.—С. 63—69.

УДК 577.152.611:577.217.535
Надійшла до редакції 26.02.05