

Участь азотистих основ у формуванні просторової структури тРНК^{Leu} із *Thermus thermophilus*

О. П. Коваленко, І. А. Крикливий, М. А. Тукало

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Методами хімічної модифікації вивчено реакційну здатність азотистих основ, що входять до складу тРНК^{Leu} із *T. thermophilus*. Одержані результати свідчать про існування молекул тРНК^{Leu} в розчині у вигляді канонічної L-форми. В корі молекули виникають триплетні взаємодії (8–14)-21, (13–22)-9 і (15–48)-20a. Дві останні є характерною особливістю відомих просторових структур тРНК II класу. Встановлено, що залишки 15 і 21 мають різну реакційну здатність у тРНК^{Leu} і тРНК^{Ser} із *T. thermophilus*, що вказує на відмінності у просторовій будові корових частин цих тРНК.

Вступ. Особливості просторової будови тРНК II класу, які містять довгу варіабельну гілку, викликають особливий інтерес з боку дослідників. У клітинах прокариот тРНК II класу представлені тРНК^{Ser}, тРНК^{Leu} і тРНК^{Tyr}. За допомогою мутагенезу було вивчено елементи тРНК з довгою варіабельною гілкою з *Escherichia coli*, важливі для впізнавання гомологічними аміноацил-тРНК синтетазами [1–4]. Показано, що вирішальну роль для процесів специфічного аміноацилювання відіграють елементи просторової структури тРНК, особливо для тРНК^{Ser} і тРНК^{Leu}, впізнавання яких відбувається особливим антикодон-незалежним шляхом [2, 3, 5], тоді як для тРНК I класу антикодон є одним з найважливіших елементів упізнавання [6] (за винятком тРНК^{Ala} [7]). На сьогоднішній день методом рентгеноструктурного аналізу вивчено структури лише двох тРНК II класу, а саме — тРНК^{Ser} [8] і тРНК^{Tyr} [9] із *T. thermophilus*, та практично відсутня інформація про особливості просторової структури прокариотичних тРНК^{Leu}. Відомо, що важливу роль у специфічному впізнаванні тРНК^{Leu} *E. coli* лейцил-тРНК синтетазою відіграють нуклеотиди D-петлі, причому саме як елементи просторової структури тРНК [2, 10]. Раніше ми порівняли реакційну здатність фосфатних залишків у тРНК^{Ser} і тРНК^{Leu} із *T. thermophilus*

[11] і не виявили відмінностей на рівні нуклеотидів D-петлі. Відомо також, що внутрішньомолекулярні взаємодії в тРНК відбуваються за участі не лише рибозофосфатного остова, але й азотистих основ. Тому наступним етапом стало вивчення реакційної здатності азотистих основ, які входять до складу тРНК^{Leu} із *T. thermophilus*, що дало нам можливість провести порівняння з аналогічними даними для тРНК^{Ser} *T. thermophilus* [12].

Матеріали і методи. Індивідуальну тРНК^{Leu} (CAG) із *T. thermophilus* виділяли за схемою, викладеною у повідомленні [13].

У представленій роботі використано диметилсульфат, гідразин («Fluka», Швейцарія); діетилпірокарбонат («Calbiochem», США); боргідрид натрію («Serva», Німеччина); фосфодіестеразу отрути змії (КФ 3.1.4.1; «Sigma», США); тРНК-нуклеотидилтрансферазу дріжджів, яку люб'язно надано З. М. Петрушенку (ІМБіГ НАН України); [α -³²P]АТР, [γ -³²P]АТР з питомою активністю 2000–3000 Ки/ммоль («Amersham», Англія).

тРНК^{Leu}, що містила ³²P на 3'-кінці, отримували, як описано в роботі [14].

Алкілювання атома N7 гуанозинів і атома N3 цитидинів диметилсульфатом, атома N7 аденозинів — діетилпірокарбонатом і наступні реакції розщеплення тРНК за модифікованими основами здійснювали, як у роботі [12]. Інкубацію проводили в 50 мМ какодилаті натрію, рН 7,0, 10 мМ MgCl₂ при температурі 65 °С (контрольні інкубації і нативні

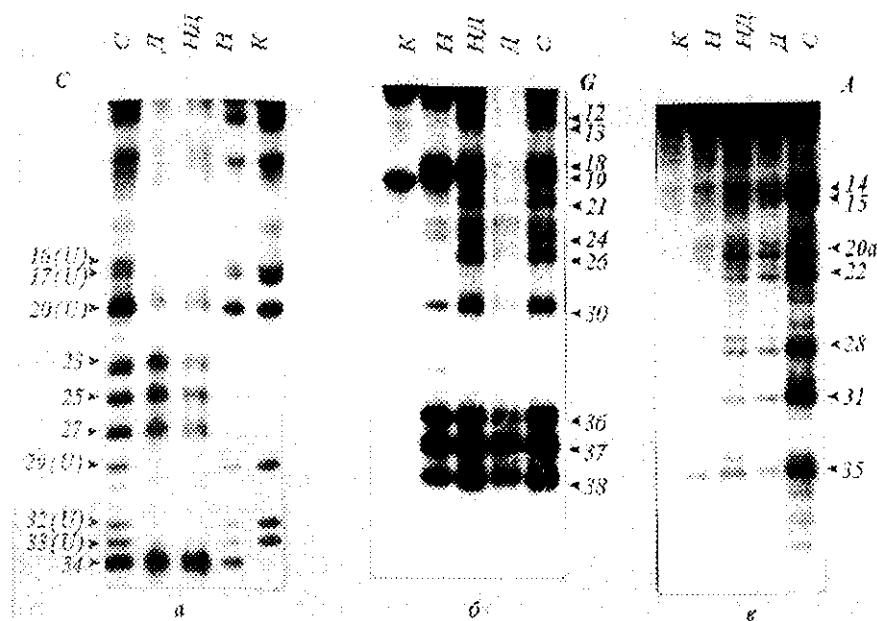


Рис. 1. Авторадіограми ПНААГ, в яких було розділено фрагменти тРНК^{Leu} *T. thermophilus*, одержані в результаті модифікації залишків цитидину (а) і гуанозину (б) диметилсульфатом, аденозину (в) — діетилпірокарбонатом в умовах: нативних (Н), напівденатурації (Н/Д) і денатурації (Д) структури тРНК, а також за умов, у яких визначали нуклеотидну послідовність тРНК^{Leu} *T. thermophilus* (аналогічно до [13]) (С); К — контрольні інкубації за відсутності реагенту

умови) і за присутності 1 мМ ЕДТА, але за відсутності MgCl₂ при 65 °С (умови напівденатурації) або 90 °С (умови денатурації).

Результати і обговорення. Для модифікації азотистих основ у тРНК^{Leu} *T. thermophilus* використовували два класичних хімічних реагенти: диметилсульфат (для визначення реакційної здатності атома N7 гуанозинів і атома N3 цитидинів) і діетилпірокарбонат (для атома N7 аденозинів). Радіоавтографи типових експериментів, які демонструють результати модифікації нуклеотидів антикодонової і D-гілок, наведено на рис. 1. Узагальнені результати модифікації азотистих основ в тРНК^{Leu} *T. thermophilus* представлено в таблиці. Розташування в структурі тРНК^{Leu} нуклеотидних залишків, основи яких мають низьку реакційну здатність за нативних умов, показано на рис. 2. Необхідно зауважити, що нам не вдалося вивчити реакційну здатність залишків гуанозину і цитидину, розташованих на 5'-ділянці акцепторного стебла (положення 1—7). Це спричинено методичними труднощами, насамперед, низьким включенням ³²P по 5'-кінцю тРНК^{Leu} і, як наслідок, недостатньою для проведення експериментів кількістю міченої тРНК. З іншого боку, в експериментах з використанням 3'-міченої тРНК^{Leu} розділення геля на відповідній ділянці не дозволило зробити обґрунтованих висновків щодо рівня модифікації основ G1, C2, C3 і G4—G7.

За умов денатурації всі залишки гуанозину, цитидину і аденозину повністю реакційноздатні. В нативних умовах низький рівень модифікації спо-

стерігали для всіх залишків цитидину, розташованих в стеблових ділянках, що обумовлено участю атомів N3 в утворенні уотсон-криківських пар нуклеотидів. За нативних умов відбувається зниження реакційної здатності всіх залишків аденозину, розташованих у двоспиральних ділянках, що пов'язано з виникненням стекінг-взаємодій, які перешкоджають дії діетилпірокарбонату. Виникненням стекінг-взаємодій можна пояснити зниження реакційної здатності залишків гуанозину в положеннях 24, 30, 43, 45, 49 і 64, але треба зазначити, що реакція модифікації диметилсульфатом чутлива до стекінг-взаємодії лише тих залишків гуанозину, які знаходяться між двома іншими пуриновими залишками на двоспиральних ділянках з регулярною структурою [15]. Тому залишки G10, G47b, G47f-G47h, G70, G71 мають високий рівень модифікації і в нативних умовах.

Реакційна здатність нуклеотидних залишків G13, A14, A15, A20a, G21, A22 (D-петля), C56, A57, G59 (T-петля), G9, G26 і G47j знижена в нативних умовах, що вказує на їхню участь у внутрішньомолекулярних взаємодіях при утворенні просторової структури тРНК^{Leu} *T. thermophilus*. Решта залишків, розташованих на одноланцюгових ділянках, мають високий рівень модифікації відповідними хімічними реагентами і за нативних умов.

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що в розчині тРНК^{Leu} *T. thermophilus* існує у вигляді канонічної L-форми. Взаємодія D- і T-петель відбувається з виникненням пари уотсон-криківського типу G18—C56, про що свідчить від-

Результати модифікації мРНК^{Leu} *T. thermophilus* диметилсульфатом і діетилпірокарбонатом

Положення	Основа	Ступінь модифікації	Положення	Основа	Ступінь модифікації
1	G	НВ	46	C	-±
2	C	НВ	47	C	-±
3	C	НВ	47a	C	-±
4	G	НВ	47b	G	+
5	G	НВ	47c	C	+
6	G	НВ	47d	A	+
7	G	НВ	47e	A	+
9	G	-+	47f	G	+
10	G	+	47g	G	+
11	C	-±	47h	G	+
12	G	-+	47i	C	-+
13	G	-+	47j	G	±+
14	A	-+	49	G	±+
15	A	-+	50	C	-+
18	G	+	51	G	-+
19	G	+	52	G	-+
20a	A	±+	53	G	-+
21	G	-+	56	C	-+
22	A	-+	57	A	-+
23	C	-+	59	G	-+
24	G	-+	61	C	-+
25	C	-+	62	C	--
26	G	-+	63	C	--
27	C	-+	64	G	±+
28	A	-+	65	C	-±
30	G	±+	66	C	-±
31	A	-+	67	C	-±
35	C	+	68	C	-±
35	A	+	69	C	-+
36	G	+	70	G	+
37	G	+	71	G	+
38	G	+	72	C	-+
40	C	-+	73	A	+
41	A	-+	74	C	+
43	G	-+	75	C	+
45	G	±+			

Примітка: «- →» — залишок набуває реакційної здатності лише в умовах денатурації (іони Mg^{2+} відсутні, 1 мМ ЕДТА, 90 °С); «- +» — залишок реакційноздатний в умовах напівденатурації (іони Mg^{2+} відсутні, 1 мМ ЕДТА, 65 °С); «+ +» — залишок активний і в нативних умовах (за присутності 10 мМ $MgCl_2$, 65 °С). НВ — реакційну здатність залишку не визначено.

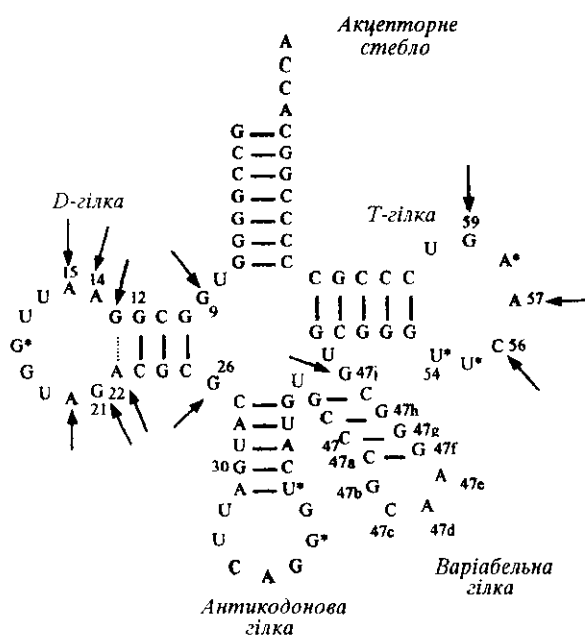


Рис. 2. Структура тРНК^{Leu} *T. thermophilus* у вигляді листка конюшини. Вказано нуклеотидні залишки, азотисті основи яких мають низький рівень модифікації специфічними хімічними реагентами в нативних умовах, за винятком залишків, розташованих у дволанцюгових ділянках. Зірочками позначено мінорні нуклеотидні залишки. Нуклеотидну послідовність тРНК^{Leu} (CAG) *T. thermophilus* надано у відповідності до послідовності гена цієї тРНК (Г. Д. Яремчук, неопубліковані результати)

сутність модифікації атома N3 залишку C56 у нативних умовах. Наявність у Т-гілці тРНК^{Leu} *T. thermophilus* консервативних залишків у положеннях 54, 58 і 61, а також низька реакційна здатність основи залишку A57 і фосфатів нуклеотидів 58 і 60 [11] вказують на канонічне просторове укладання Т-гілки. Утворення L-форми молекули супроводжується також виникненням пари G26—U44, нуклеотиди якої вступають у стекинг-взаємодії з нуклеотидними парами антикодонової і D-стебел, чим можна пояснити низьку реакційну здатність основи залишку G26. Згадані внутрішньомолекулярні взаємодії характерні для тРНК як I, так і II класу і докладно описані в роботах [16—19]. Зниження реакційної здатності основ G51—G53 відбувається, найімовірніше, внаслідок взаємодії з іоном металу, як це спостерігали в кристалі тРНК^{Phe} дріжджів [20]. Азотисті основи залишків антикодонової і варіабельної петель не беруть участі у підтриманні просторової структури тРНК^{Leu} *T. thermophilus*, про що свідчить їхня висока реакційна здатність у нативних умовах.

Найбільшу цікавість викликають просторові взаємодії, які відбуваються за участі нуклеотидів D-петлі. Для тРНК^{Leu} *T. thermophilus*, як і для інших тРНК II класу, характерна незвичайна пурин-пуринова пара 13—22 в D-стеблі. Спираючись на дані рентгеноструктурних досліджень тРНК^{Ser} із *T. thermophilus* [8], можна припустити, що в утворенні цієї пари задіяний атом N7 залишку A22. На це вказує відсутність модифікації його діетилпірокарбонатом за нативних умов. Стекинг-взаємодія пари 13—22 з іншими парами D-стебла створює перешкоди для метилювання атома N7 залишку G13 та є причиною низької реакційної здатності останнього. Відсутність реакційної здатності залишку G9 і низький рівень модифікації фосфатної групи нуклеотиду A22 [11] свідчать на користь існування в корі молекули тРНК^{Leu} взаємодій між G13—A22 і G9, а також між P22 і G9, як це спостерігали для структури тРНК^{Ser} у кристалі [8].

Участь в корових взаємодіях можна пояснити низьким рівнем модифікації залишку A14, який взаємодіє з U8 з утворенням пари нуклеотидів 8—14. Ця пара не відноситься до уотсон-кріківського типу: водневі зв'язки між основами утворюються за участі атома N7 аденозину [16, 17, 21]. В тРНК^{Ser} із *T. thermophilus* пара 8—14 входить до складу триплету (8—14)-21. Імовірно, що така взаємодія відбувається і в тРНК^{Leu}, але на відміну від A21 в тРНК^{Ser} [12], G21 в тРНК^{Leu} має низьку реакційну здатність, яка навряд чи обумовлена участю атома N7(G21) у водневих зв'язках з нуклеотидами пари 8—14, якщо брати до уваги геометрію відповідного триплету в тРНК^{Ser} *T. thermophilus* [8]. Низька реакційна здатність залишку G21, скоріш за все, є наслідком сильної стекинг-взаємодії між G21 і нуклеотидами корової частини тРНК^{Leu}, яка перешкоджає дії реагенту-модифікатора.

Низька реакційна здатність залишку A15 вказує на існування в корі тРНК^{Leu} *T. thermophilus* пари нуклеотидів 15—48, яка характерна для просторової будови молекул тРНК як I, так і II класу [8, 9, 16, 17, 19, 21, 22]. Як відомо з результатів рентгеноструктурного аналізу кристалів тРНК^{Phe} дріжджів [16, 17], пара нуклеотидів 15—48 розташована над парою нуклеотидів 8—14 і знаходиться в стекинг-взаємодії з останньою, що створює перешкоди для алкілювання атома N7(G15) диметилсульфатом [15]. Як і в тРНК^{Ser} *T. thermophilus*, нуклеотиди пари 15—48 можуть додатково утворювати зв'язки з основою A20a, низька реакційна здатність якої свідчить про її участь у просторових взаємодіях. Результати вивчення детермінант специфічності тРНК^{Leu} *E. coli* [2], а також селекція *in vitro*

варіантів молекули тРНК^{Leu} *E. coli* з випадковими нуклеотидними послідовностями D-петлі, здатних до аміноацилювання гомологічною лейцил-тРНК синтетазою [10], вказують на важливу роль залишку аденозину в положенні 20а для впізнання тРНК^{Leu} ферментом саме як елемента просторової структури. З нуклеотидами пари 15—48 знаходиться у стекингу основа залишку G59, про що свідчить її низька реакційна здатність в умовах, які стабілізують просторову структуру тРНК.

Отже, одержані нами результати засвідчують, що кор тРНК^{Leu} *T. thermophilus* побудований з трьох шарів триплетних взаємодій: (15—48)-20а, (8—14)-21, (13—22)-9. Четвертий шар представлений залишком у положенні 59, основа якого розташована над основами пари 15—48 і знаходиться з ними у стекинг-взаємодії. Саме такі просторові взаємодії спостерігали і в корі тРНК^{Ser} *T. thermophilus* [8], але в тРНК^{Leu} залишки у положеннях 15 і 21 мають низьку реакційну здатність, тоді як в тРНК^{Ser} реакційна здатність залишку G15 лише дещо знижена, а залишок A21 має високу реакційну здатність і в нативних умовах [12]. Знайдені відмінності свідчать, на нашу думку, про різну конфігурацію корових триплетних взаємодій в тРНК^{Leu} і тРНК^{Ser}, що обумовлено відсутністю в D-петлі тРНК^{Leu} додаткового нуклеотидного залишку в положенні 20b.

За даними рентгеноструктурного аналізу кристала комплексу тРНК^{Ser}—серил-тРНК синтетаза із *T. thermophilus* [8], залишок G20b «виштовхує» залишки G9 і A21 з площин відповідних триплетних взаємодій і вони розташовуються під кутом ~45°. У структурі тРНК^{Tyr} із *T. thermophilus* залишок 20b менше занурений в кор і триплетна взаємодія (8—14)-21 має планарнішу конфігурацію [9]. Можливо, за відсутності залишку в положенні 20b триплетні корові взаємодії залишаються планарними, і між нуклеотидами виникають сильні стекинг-взаємодії, чому додатково сприяє переважно пуринова природа залишків, що входять до складу триплетів.

Взаємодія довгої варіабельної гілки тРНК^{Leu} *T. thermophilus* з кором молекули відбувається за участі залишку G47j, на що вказує знижена реакційна здатність відповідної основи, але з'ясування того, якими чином відбувається ця взаємодія, потребує додаткових структурних досліджень.

Таким чином, наші дослідження свідчать про існування відмінностей в будові тРНК^{Leu} і тРНК^{Ser} із *T. thermophilus*, які реалізуються на рівні корових триплетних взаємодій і, можливо, відіграють важливу роль у процесах специфічного впізнання тРНК^{Leu} лейцил-тРНК синтетазою.

Роботу частково профінансовано медінститутом Говарда Г'юза (США), грант № 75195-548201.

O. P. Kovalenko, I. A. Kriklyviy, M. A. Tukalo

Participation of nitrogen bases in the tertiary folding of tRNA^{Leu} from *Thermus thermophilus*

Summary

Reactivity of bases in tRNA^{Leu} from *T. thermophilus* has been studied by chemical modification methods. Obtained results suggest that molecules of tRNA^{Leu} have a canonical L-form in solution. Triple interactions (8—14)-21, (13—22)-9 and (15—48)-20a are observed in the core. The latter two interactions represent the characteristic feature of the class II tRNA tertiary structures. Different reactivity of bases 15 and 21 in tRNA^{Leu} and tRNA^{Ser} from *T. thermophilus* indicates differences in the core tertiary structure of these tRNAs.

O. П. Коваленко, И. А. Крикливый, М. А. Тукало

Участие азотистых оснований в формировании пространственной структуры тРНК^{Leu} из *Thermus thermophilus*

Резюме

Методами химической модификации изучена реакционная способность азотистых оснований, входящих в состав тРНК^{Leu} *T. thermophilus*. Полученные результаты свидетельствуют о канонической пространственной L-форме молекул тРНК^{Leu} в растворе. В коре молекулы возникают триплетные взаимодействия (8—14)-21, (13—22)-9 и (15—48)-20а. Два последних являются характерной особенностью известных пространственных структур тРНК II класса. Установлено, что остатки 15 и 21 имеют разную реакционную способность в тРНК^{Leu} и тРНК^{Ser} из *T. thermophilus*, что указывает на отличия в пространственной структуре коровых частей этих тРНК.

ПЕРЕЛК ЛІТЕРАТУРИ

1. Himeno H., Hasegawa T., Ueda T. Conversion of aminoacylation specificity from tRNA^{Tyr} to tRNA^{Ser} in vitro // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 23.—P. 6815—6819.
2. Asahara H., Himeno H., Tamura K., Hasegawa T., Watanabe K., Shimizu M. Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA^{Leu} and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser} and tRNA^{Tyr} // J. Mol. Biol.—1993.—231, N 2.—P. 219—229.
3. Asahara H., Himeno H., Tamura K., Nameki N., Hasegawa T., Shimizu M. *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} by its characteristic tertiary structure // J. Mol. Biol.—1994.—236, N 3.—P. 738—748.
4. Tocchini-Valentini G., Saks M., Abelson J. tRNA leucine identity and recognition sets // J. Mol. Biol.—2000.—298, N 5.—P. 779—793.
5. Normanly J., Ogden R. C., Horvath S. J., Abelson J. Changing the identity of a transfer RNA // Nature.—1986.—321, N 6067.—P. 213—219.
6. Giege R., Sissler M., Florentz C. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity // Nucl. Acids Res.—1998.—26, N 22.—P. 5017—5035.
7. Tamura K., Asahara H., Himeno H., Hasegawa T., Shimizu M. Identity elements of *E. coli* tRNA^{Ala} // J. Mol. Recog.—1991.—4, N 4.—P. 129—132.
8. Biou V., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase

- complexed with tRNA^{Ser} // *Science*.—1994.—263, N 5152.—P. 1404—1410.
- Yaremchuk A., Kriklyvi I., Tukalo M., Cusack S. Class I tyrosyl-tRNA synthetase has a class II mode of cognate tRNA recognition // *EMBO J.*—2002.—21, N 14.—P. 3829—3840.
- Asahara H., Nameki N., Hasegawa T. *In vitro* selection of RNAs aminoacylated by *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase // *J. Mol. Biol.*—1998.—283, N 3.—P. 605—618.
- Коваленко О. П., Петрушенко З. М., Крикливий І. А., Яремчук А. Д., Тукало М. А. Сравнительное изучение реакционной способности остатков фосфорной кислоты, входящих в состав тРНК^{Ser} и тРНК^{Leu} из *Thermus thermophilus* // *Биоорг. химия*.—1999.—25, № 10.—С. 768—773.
- Коваленко О. П., Крикливий І. А., Тукало М. А. Вивчення елементів просторової структури тРНК^{Ser} *Thermus thermophilus* у розчині // *Биополимеры и клетка*.—2000.—16, № 2.—С. 115—123.
- Петрушенко З. М., Коваленко О. П., Мальченко Н. Н., Крикливий І. А., Яремчук А. Д., Тукало М. А. Первичная структура тРНК^{Ser} из *Thermus thermophilus* // *Биополимеры и клетка*.—1997.—13, № 3.—С. 202—208.
- Silberklang M., Gillum A. M., RajBhandary U. L. The use of nuclease P1 in sequence analysis of end group labeled RNA // *Nucl. Acids Res.*—1977.—4, N 12.—P. 4091—4108.
- Romby P., Moras D., Dumas P., Ebel J.-P., Giege R. Comparison of the tertiary structure of yeast tRNA^{Asp} and tRNA^{Phe} in solution. Chemical modification study of the bases // *J. Mol. Biol.*—1987.—195, N 1.—P. 193—204.
16. Kim S.-H., Quigley G. J., Suddath F. L., Mepherson A., Kim J.-J., Weinzierl J., Rich A. Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain // *Science*.—1973.—179, N 4070.—P. 285—288.
17. Jack A., Ladner J. E., Klug A. Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution // *J. Mol. Biol.*—1976.—108, N 4.—P. 619—629.
18. Romby P., Carbon P., Westhof E., Ehresmann C., Ebel I.-P., Ehersmann B., Giege R. Importance of conserved residues for the conformation of the T-loop in tRNAs // *J. Biomol. Struct. and Dyn.*—1987.—5, N 3.—P. 669—687.
19. Dock-Bregeon A. C., Westhof E., Giege R., Moras D. Solution structure of a tRNA with a large variable region: yeast tRNA^{Ser} // *J. Mol. Biol.*—1989.—206, N 2.—P. 707—722.
20. Teter M., Quigley G. J., Rich A. The binding of metals to tRNA // *Metal ions in genetic information transfer* / Eds L. Gunther, L. Eichhorn, G. L. Marzilli.—New York: Elsevier, 1981.—P. 233—272.
21. Westhof E., Dumas D., Moras D. Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA // *J. Mol. Biol.*—1985.—184, N 1.—P. 119—145.
22. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Изучение пространственной структуры тРНК^{Leu} (IAG) из молочной железы коров методом химических модификаций // *Биоорг. химия*.—1988.—14, № 1.—С. 31—36.