

Выделение гистидиновой тРНК из *Thermus thermophilus* и изучение ее первичной структуры и участков взаимодействия с гомологичной аминоксил-тРНК синтетазой

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

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев 03143, Украина

mtukalo@imbg.org.ua

Структура гистидиновых тРНК (тРНК^{His}) отличается от структур тРНК других аминокислотных специфичностей наличием на 5'-конце дополнительного нуклеотида (G-1). Для изучения молекулярного механизма взаимодействия тРНК^{His} с гистидил-тРНК синтетазой разработан метод очистки тРНК^{His} из *T. thermophilus* и изучена первичная структура изоакцепторной формы тРНК_I^{His}. Индивидуальную тРНК^{His} выделяли из суммарной тРНК, используя комбинацию хроматографии низкого давления на бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозе (БД-целлюлоза) и ДЭАЭ Toyopearl 650 с жидкостной хроматографией высокого давления на колонках DEAE 5PW и Ultrapore C8. Первичную структуру тРНК_I^{His} из *T. thermophilus* определяли с использованием методов быстрого гель-секвенирования. Изученная структура отличается от тРНК^{His} из *Escherichia coli* по 23 положениям. Участки взаимодействия тРНК_I^{His} из *T. thermophilus* с гистидил-тРНК синтетазой исследовали с помощью метода химической модификации нитрозоз-тиломочвиной. Показано, что гистидил-тРНК синтетаза защищает от алкилирования этилнитрозомочвиной следующие фосфаты тРНК^{His}: 8 — между акцепторным и D-стеблем; 27, 28, 29 — с 5'-стороны антикодона стебля; фосфат 34 в антикодоне и фосфаты 67, 68 с 3'-стороны акцепторного стебля. Все обнаруженные участки тРНК^{His} локализованы на одной стороне пространственной структуры тРНК — там же, где и вариабельный стебель. D-стебель находится с противоположной стороны и не взаимодействует с ферментом.

Ключевые слова: тРНК, аминоксил-тРНК синтетаза, РНК-белковое узнавание, химическая модификация.

Введение. Точность биосинтеза белка зависит от правильного аминокислотирования тРНК аминокислотами. Эта реакция катализируется аминоксил-тРНК синтетазами, специфически узнающими гомологичную аминокислоту и тРНК. В настоящее время достигнуты значительные успехи в решении вопроса, каким образом аминоксил-тРНК синтета-

зы узнают специфические тРНК из пула различных тРНК, имеющих сходную третичную структуру [1, 2]. Структура гистидиновых тРНК отличается от структур тРНК других аминокислотных специфичностей наличием на 5'-конце дополнительного нуклеотида G-1, образующего дополнительную пару с дискриминаторным основанием в положении 73, поэтому акцепторный стебель тРНК^{His} на одну нуклеотидную пару длиннее, чем у других тРНК. У тРНК^{His} прокариотов и органелл

дискриминаторным основанием является C73, у эукариотов — A73 и G73 [3].

Изучение аминоацилирования *in vitro* транскриптов тРНК^{His} *Escherichia coli* показало, что пара G-1—C73 является наиболее важной детерминантой узнавания гистидил-тРНК синтетазой, в то время как антикодон играет менее выраженную роль [4]. С другой стороны, исследование аминоацилирования транскриптов тРНК^{His} из дрожжей выявило, что вклад антикодона в узнавание тРНК гистидил-тРНК синтетазой больше по сравнению с ролью дискриминаторного основания [5]. В настоящее время получены кристаллы комплексов гистидил-тРНК синтетазы *E. coli* и *T. thermophilus* с низкомолекулярными субстратами — гистидином и гистидиниладенилатом, и при помощи рентгеноструктурного анализа выяснена их структура, а также предложен механизм активации гистидина [6—9]. На основании изучения распределения зарядов на поверхности гистидил-тРНК синтетазы *T. thermophilus* и сравнения этих результатов с данными для других аминоацил-тРНК синтетаз IIa класса предложена модель узнавания тРНК^{His} ферментом [8]. Получены также кристаллы комплекса тРНК^{His}—гистидил-тРНК синтетазы *T. thermophilus* [7], но структура этого комплекса пока не определена, поэтому существенный интерес представляет изучение взаимодействия тРНК^{His} с гистидил-тРНК синтетазой в растворе.

В данной работе описано выделение тРНК^{His} *T. thermophilus*, определение ее первичной структуры и изучение участков взаимодействия с гистидил-тРНК синтетазой в растворе.

Материалы и методы. В работе использовали [α -³²P]АТР, [γ -³²P]АТР, [5'-³²P]рСр с удельной активностью 2000—3000 Ки/ммоль («Amersham», Англия); Т1-РНКазу из *Aspergillus oryzae* («Sankyo», Япония); щелочную фосфатазу *E. coli* («Worthington», США); Т4-полинуклеотидкиназу («Boehringer», ФРГ); нуклеазу Р1 из *Penicillium citrinum* («Calbiochem», США); РНКазы V1 из яда кобры, РнМ из *P. polycephalum*, U2 из *Ustilago sphaerogena*, CL3 из печени цыпленка, РНКазу из *Bacillus cereus* — производства «Pharmacia» (Швеция). Этилнитрозомочевина синтезирована А. Г. Терентьевым (ИМБиг НАН Украины).

Клетки экстремального термофила *T. thermophilus* NB-27 выращивали в ферментере объемом 300 л в среде, содержащей пептон (2 %), дрожжевой экстракт (1 %) и NaCl (0,2 %), при темпера-

туре 74—76 °С и интенсивной аэрации со скоростью 200 об/мин. Клетки собирали центрифугированием.

Суммарную тРНК получали фенольной экстракцией РНК из биомассы с последующей депротенизацией смесями фенол:хлороформ (1:1) и хлороформ:изоамиловый спирт (9:1) [10]. Для очистки препарата РНК от белков и примесей нуклеотидной и полисахаридной природы использовали хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, уравновешенной 0,0125 М трис-НСl, рН 7,5. Примеси элюировали вначале 0,15 М NaCl, а затем 0,25 М NaCl в том же буфере. тРНК с колонки элюировали 1 М NaCl, осаждали 2,5 объема охлажденного этилового спирта в присутствии 2 % ацетата калия. Осадок тРНК собирали центрифугированием, промывали 70 %-м этиловым спиртом и высушивали.

Индивидуальную тРНК^{His} выделяли из суммарной тРНК, используя хроматографию на бензоилированной ДЭАЭ-целлюлозе (БД-целлюлоза), ДЭАЭ Toyorearl 650 и жидкостную хроматографию высокого давления (ЖХВД) на колонках DEAE 5PW и Ultrapore C8 (оборудование «Gold System» фирмы «Beckman», США).

Гистидил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* получена в гомогенном состоянии методом, описанным ранее [7].

Акцепторную активность тРНК^{His} на разных стадиях очистки определяли по максимальному уровню образования ¹⁴C-гистидил-тРНК. Стандартная реакционная смесь в объеме 0,25 мл содержала 0,1 М трис-НСl, рН 7,6, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ АТР, 0,02 мМ ¹⁴C-гистидин, 0,4 мг суммарного препарата аминоацил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* и 0,05 мл раствора тРНК из исследуемых фракций. Реакционную смесь инкубировали в течение 7 мин при 65 °С, реакцию останавливали добавлением 0,5 мл охлажденной 10 %-й ТХУ. Осадки аминоацил-тРНК наносили на фильтры GFC, промывали 2 %-й ТХУ, высушивали и определяли радиоактивность в толуольном сцинтилляторе.

Мечение тРНК^{His} радиоактивным фосфором по 3'-концу проводили с помощью [5'-³²P]рСр и РНК-лигазы [11], [α -³²P]АТР и тРНК-нуклеотидил-трансферазы [12], выделенной, как описано в работе [13]. По 5'-концу тРНК^{His} метили с использованием [γ -³²P]АТР в реакции кинирования [14].

Первичную структуру тРНК^{His} изучали, используя два метода секвенирования меченой тРНК: специфическую химическую дегградацию [17] и

ферментативное секвенирование, основанное на гидролизе тРНК специфическими эндонуклеазами [16, 17].

Ферментативное расщепление тРНК^{His} из *T. thermophilus* проводили в течение 15 мин при 55 °С в 5 мкл буфера. Для РНКаз T1 и PvuM использовали 20 мМ Na-цитрат, рН 5,0, 1 мМ ЭДТА, 7 М мочевины; для U2 — 20 мМ Na-цитрат, рН 3,5, 1 мМ ЭДТА, 7 М мочевины; для РНКазы из *B. cereus* — 20 мМ Na-цитрат, рН 5,0, 1 мМ ЭДТА; для РНКазы CL3 — 10 мМ Na-фосфат, рН 6,5, и 4,2 М мочевины. Фрагменты тРНК разделяли электрофоретически в 12,5 %-м и 20 %-м ПААГ, содержащем 8 М мочевины.

Алкилирование меченой тРНК^{His} и ее комплекса с гистидил-тРНК синтетазой проводили с помощью этилнитрозомочевины в условиях, стабилизирующих пространственную структуру тРНК и в то же время способствующих образованию специфического комплекса тРНК^{His}—гистидил-тРНК синтетаза [18]. Реакционная смесь в конечном объеме 25 мкл содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,9, 5 мМ MgCl₂, 2,5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,8 мкМ тРНК^{His}, 3,2 мкМ гистидил-тРНК синтетазу и 2,5 мкл насыщенного раствора этилнитрозомочевины в этиловом спирте.

Реакцию модификации осуществляли при 37 °С в течение 2 ч и останавливали добавлением 3 мкл 3 М ацетата натрия, рН 5,5. От аминоксил-тРНК синтетазы освобождались, обрабатывая реакционную смесь равным объемом водонасыщенного фенола. тРНК осаждали добавлением трех объемов этилового спирта и 10 мкг гликогена.

В контрольном эксперименте вместо этилнитрозомочевины добавляли эквивалентный объем этанола. Алкилирование тРНК в денатурирующих условиях проводили в 25 мкл 0,3 М Na-какодилатного буфера, рН 8,0, содержащего 0,1 мМ ЭДТА, в течение 2 мин при 80 °С.

Полинуклеотидную цепь расщепляли по модифицированным фосфатам в 10 мкл 0,1 М трис-НСl, рН 9,0, в течение 5 мин при 55 °С. Полученные фрагменты тРНК разделяли при помощи электрофореза в 12,5 %-м ПААГ в 5 М трис-боратном буфере, рН 8,3, содержащем 1 мМ ЭДТА и 7 М мочевины, с последующим радиоавтографированием геля.

Электрофоретические полосы идентифицировали, сравнивая их подвижность с таковой фрагментов тРНК, полученных в результате частичного

гидролиза ее рибонуклеазой T1. Радиоавтографы гелей сканировали при помощи денситометра «UltraScan XL» фирмы «LKB» (Швеция).

Результаты и обсуждение. Выделение индивидуального препарата тРНК^{His} из *T. thermophilus*. тРНК^{His} выделяли из суммарной тРНК, используя комбинацию хроматографии низкого давления на БД-целлюлозе и ДЭАЭ Toyoparl 650 с ЖХВД на колонках DEAE SPW и Ultrapore C8.

Хроматография на БД-целлюлозе. 4 г суммарной тРНК из *T. thermophilus* наносили на колонку БД-целлюлозы (5 × 60 см), уравновешенную 50 мМ Na-ацетатным буфером, рН 4,5, содержащим 0,35 М NaCl и 10 мМ MgCl₂. тРНК элюировали вогнутым градиентом концентрации NaCl от 0,45 М (буфер А, 4,0 л) до 1,5 М (буфер Б, 2,0 л).

Вогнутую форму градиента создавали, используя градиентные сосуды разного диаметра, отношение D_A/D_B составляло 2:1. Применение такой формы приводит к уменьшению общего объема градиента на 40 % и к соответствующему ускорению процесса. Кроме того, преимущества этого градиента по сравнению с линейным состоят еще и в том, что в начале хроматографии, когда с колонки элюируется основная масса материала, создается малая крутизна градиента, а в конце хроматографии, когда тянется «хвост», градиент становится более крутым и материал элюируется более компактно. Концентрацию NaCl в смесителе после выхода объема V (C_V) рассчитывали по формуле [19]

$$C_V = C_A - ((C_A - C_B) \cdot (1 - V) / (V_A + V_B))^{(S_A/S_B)},$$

где C_A, C_B — начальные концентрации элюента в резервуаре и смесителе; V_A, V_B — начальные объемы жидкости в резервуарах; S_A, S_B — площади поперечного сечения резервуаров.

Хроматографию осуществляли со скоростью 120 мл/ч, объем фракций — 16 мл. Оставшийся на колонке материал элюировали буфером Б, содержащим 10 % этанола. В полученных фракциях определяли акцепторную активность тРНК^{His}. На рис. 1 представлена типичная хроматограмма на БД-целлюлозе, из которой видно, что тРНК^{His} находится во фракциях 270—340, эти фракции объединяли, осаждали 2,5 объема этилового спирта, высушивали и хранили при температуре -20 °С.

Хроматография на DEAE Toyoparl 650. 350 мг тРНК, полученной после хроматографии на

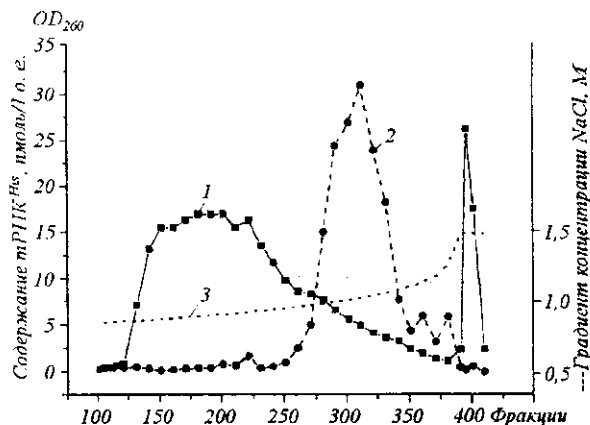


Рис. 1. Хроматография суммарного препарата тРНК из *T. thermophilus* на колонке с БД-целлюлозой: 1 — оптическая плотность при 260 нм; 2 — активность тРНК^{His}; 3 — градиент концентрации NaCl

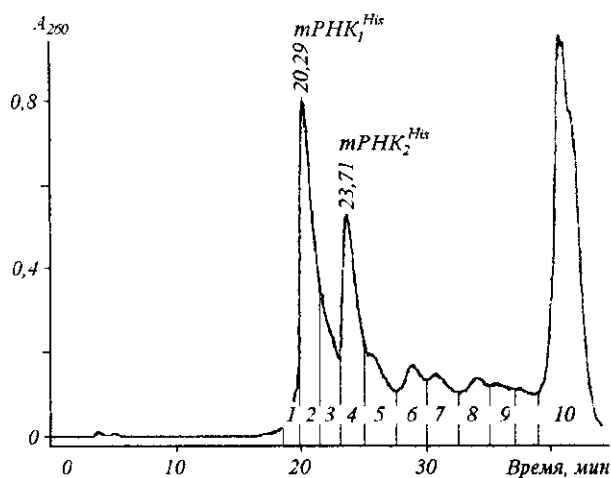


Рис. 2. Очистка тРНК^{His} из *T. thermophilus* на колонке Ultrapore C8. Вертикальными линиями отмечены фракции, которые собирали во время хроматографии. Время выхода тРНК^{His} из колонки 20,3 мин (фракция 2, степень очистки 95 %) и 23,7 мин (фракция 4, степень очистки 80 %)

БД-целлюлозе, наносили на колонку DEAE Toyopearl 650 (2,6 × 25 см), уравновешенную 10 мМ Na-ацетатным буфером, pH 4,5, содержащим 0,2 М NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 10 %-й изопропанол. тРНК с колонки элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0,2—0,3 М, объем градиента — 1600 мл, скорость элюции — 150 мл/ч, объем фракций — 15 мл. Фракции, содержащие тРНК^{His}, объединяли, осаждали этанолом и высушивали. Полученный препарат содержал около 30 % тРНК^{His}.

Дальнейшую очистку тРНК^{His} проводили на колонках высокого давления с использованием обо-

рудования для ЖХВД Gold System фирмы «Beckman» (США).

Хроматография на колонке DEAE 5PW. Для ее осуществления использовали следующие буферные растворы: буфер А — 50 мМ трис-НСl, pH 7,5, 0,2 М NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 10 %-й изопропанол; буфер Б — то же, но 1 М NaCl. Возрастание концентрации NaCl в процессе хроматографии проводили по кривой № 4, запрограммированной в Gold System. Во время хроматографии следили на дисплее за профилем элюции и вручную собирали фракции, в которых затем определяли акцепторную активность тРНК^{His}. Время выхода тРНК^{His} с колонки составляло 41 мин.

Хроматография на колонке Ultrapore C8. Последняя стадия очистки тРНК^{His} — хроматография на колонке высокого давления Ultrapore C8 с использованием Gold System. Буфер А содержал 50 мМ ацетат аммония и 10 мМ MgCl₂, буфер Б — 10 %-й изопропанол. Градиент формировали, как и в случае хроматографии на колонке DEAE 5PW. Результаты хроматографии тРНК^{His} на колонке Ultrapore C8 представлены на рис. 2. На этой стадии очистки выделены две изоакцепторные тРНК^{His} в индивидуальном состоянии. Выход препаратов составлял 2,5 и 1,7 мг для тРНК^{His}₁ и тРНК^{His}₂ соответственно. При этом чистота полученных препаратов, проверенная с помощью электрофореза в 8 %-м ПААГ с 8 М мочевиной, была не менее 98 %.

Таким образом, разработанный нами метод выделения изоакцепторных тРНК^{His} дает возможность получать высокоочищенные препараты тРНК, пригодные как для биохимических исследований, так и для структурной работы.

Изучение первичной структуры тРНК^{His}₁. Прежде чем приступить к изучению участков взаимодействия тРНК^{His}₁ из *T. thermophilus* с гомологичной аминоксил-тРНК синтетазой, необходимо было определить первичную структуру этой тРНК. Для этого применяли два взаимодополняющих метода: метод быстрого гель-секвенирования с использованием специфической химической деградации по Питти [15] и метод специфического нуклеазного гидролиза [17]. В результате проведенных исследований установлена полная нуклеотидная последовательность тРНК^{His}₁ из *T. thermophilus* (рис. 3). Сравнение первичной структуры изучаемой тРНК^{His}₁ со структурой тРНК^{His} из *E. coli* обнаруживает довольно большое сходство этих макромо-

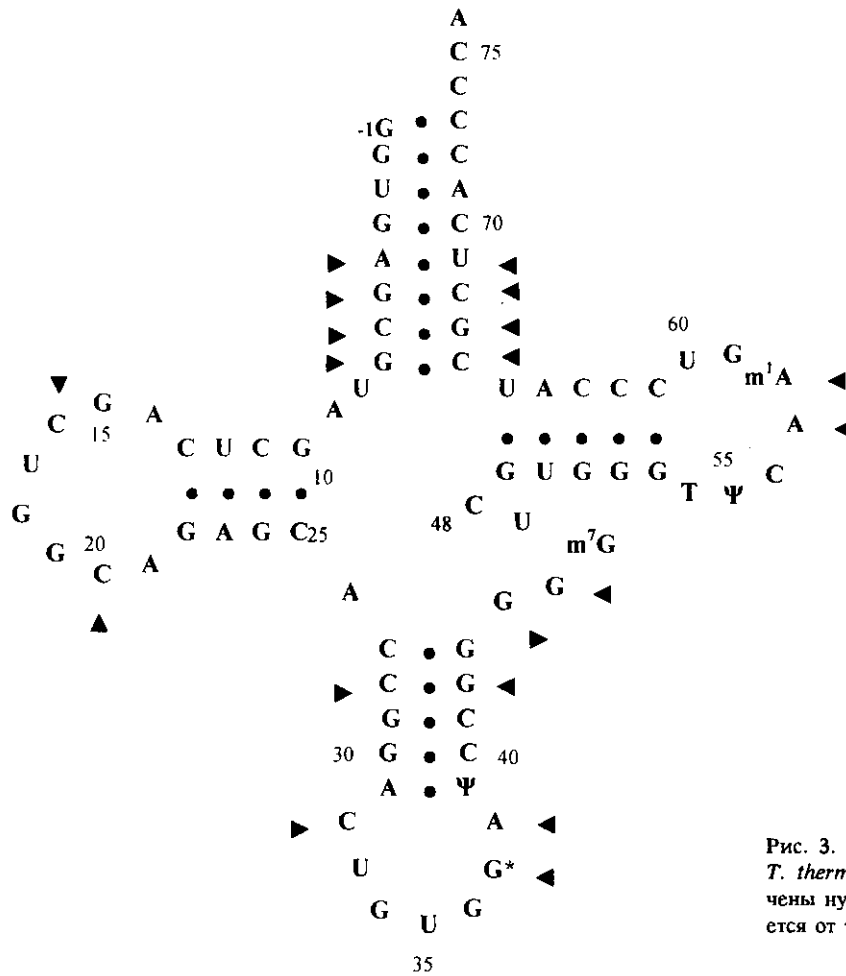


Рис. 3. Первичная структура тРНК^{His} из *T. thermophilus*. Треугольниками обозначены нуклеотиды, которыми она отличается от тРНК^{His} из *E. coli*

лекул. Различия обнаружены в 23 положениях: восемь — в акцепторном стебле, два — в D-петле, одно — между D-стеблем и антикодонавым стеблем, три — в антикодонавом стебле, три — в антикодонавой петле, два — в T-петле (рис. 3). Из полученных данных по первичной структуре тРНК^{His} из *T. thermophilus* видно, что она имеет на 5'-конце дополнительный нуклеотид G-1 и дополнительную пару G-1—C73 в акцепторном стебле. Эти особенности структуры тРНК характерны для всех известных тРНК^{His} из прокариотов [3].

Изучение взаимодействия тРНК^{His} с гистидил-тРНК синтетазой методом химической модификации. Участки взаимодействия тРНК^{His} из *T. thermophilus* с гомологичной синтетазой исследовали с помощью метода химической модификации нитрозозтилмочевинной. Ранее установлено, что алкилирование фосфатных групп тРНК затруднено в местах контакта с ферментом [18].

На рис. 4 представлен радиоавтограф ПААГ после разделения фрагментов, полученных в результате расщепления 3'-³²P-меченных тРНК^{His} из *T. thermophilus*, алкилированных нитрозозтилмочевинной в отсутствие и в присутствии гистидил-тРНК синтетазы. Видно, что в эксперименте, где тРНК алкилировали в присутствии гомологичного фермента, модификация некоторых фосфатов происходит в меньшей степени по сравнению с экспериментами, где тРНК модифицировали в отсутствие синтетазы.

Интенсивности электрофоретических полос, отражающие степень модификации фосфатов, определяли при помощи сканирующего денситометра и рассчитывали относительные реакционные способности остатков фосфорной кислоты тРНК^{His}, находящейся в комплексе с ферментом по сравнению со свободной тРНК (рис. 5). Из данных этого рисунка следует, что гистидил-тРНК синтетазы за-

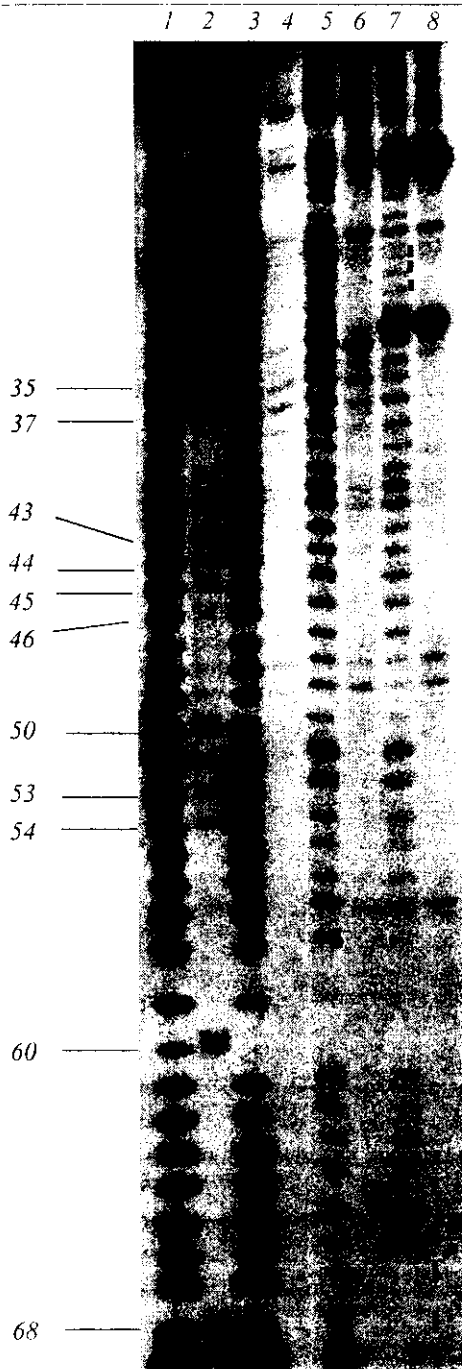


Рис. 4. Радиоавтограф после разделения фрагментов, полученных в результате расщепления тРНК^{His} из *T. thermophilus*, алкилированной этилнитрозомочевинной в условиях, денатурирующих (1) и стабилизирующих (3, 5) пространственную структуру тРНК, а также в присутствии гистидил-тРНК синтетазы (7); скобками обозначены факторы, уровень модификации которых существенно понижается в присутствии гистидил-тРНК синтетазы. Соответствующие контрольные инкубации (4, 6, 8) проводили в отсутствие этилнитрозомочевинной; 2 — тРНК^{His}, частично гидролизованная нуклеазой T1. Нумерация полос соответствует положению факторов в структуре тРНК^{His}

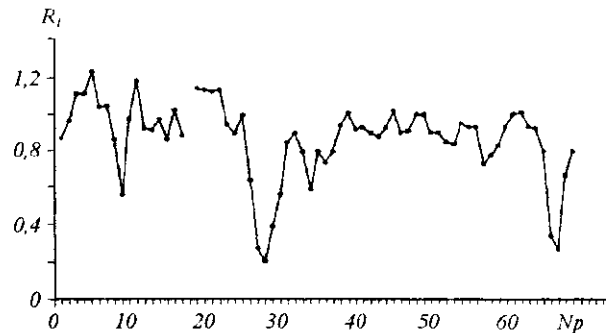


Рис. 5. Отношение реакционной способности остатков фосфорной кислоты (R_1) в тРНК₁^{His} из *T. thermophilus* при алкилировании этилнитрозомочевинной в присутствии гистидил-тРНК синтетазы к реакционной способности соответствующих фосфатов в свободной тРНК. R_1 — отношение интенсивностей, соответствующих электрофоретических полос в экспериментах по алкилированию свободной тРНК^{His} и в присутствии гистидил-тРНК синтетазы; N_p — номера фосфатов

щищает от алкилирования этилнитрозомочевинной фосфаты тРНК^{His}, находящиеся в положениях 27, 28, 29 с 5'-стороны антикодона стебля, и 67, 68 — с 3'-стороны акцепторного стебля. Частично (более 50 %) защищается также фосфат 8 между акцепторным и D-стеблями и фосфат 34 в антикодоне. Положение указанных фосфатов в структуре тРНК^{His} показано на рис. 6.

Следует отметить, что все обнаруженные участки тРНК^{His} находятся на одной стороне пространственной структуры тРНК — в месте локализации переменного стебля, в то время как D-стебель размещен с противоположной стороны и не взаимодействует с ферментом. Таким образом, полученные данные указывают на то, что гистидил-тРНК синтетеза взаимодействует с гомологичной тРНК по типу, характерному для всех синтетаз II структурного класса, т. е. со стороны переменного стебля [20].

В литературе описано изучение комплекса тРНК^{His} из *E. coli* с гомологичной синтетазой с использованием метода защиты сульфозамещенной тРНК от модификации йодом [21]. Однако в указанной работе, кроме участков тРНК, однозначно взаимодействующих с ферментом (например, 5'-сторона антикодона стебля), обнаружена защита ряда участков, явно не совпадающих с предсказанной на основании рентгеноструктурного анализа структурой комплекса (в частности, участки D-петли). Полученные артефакты объясняются известными недостатками используемого авторами метода [22].

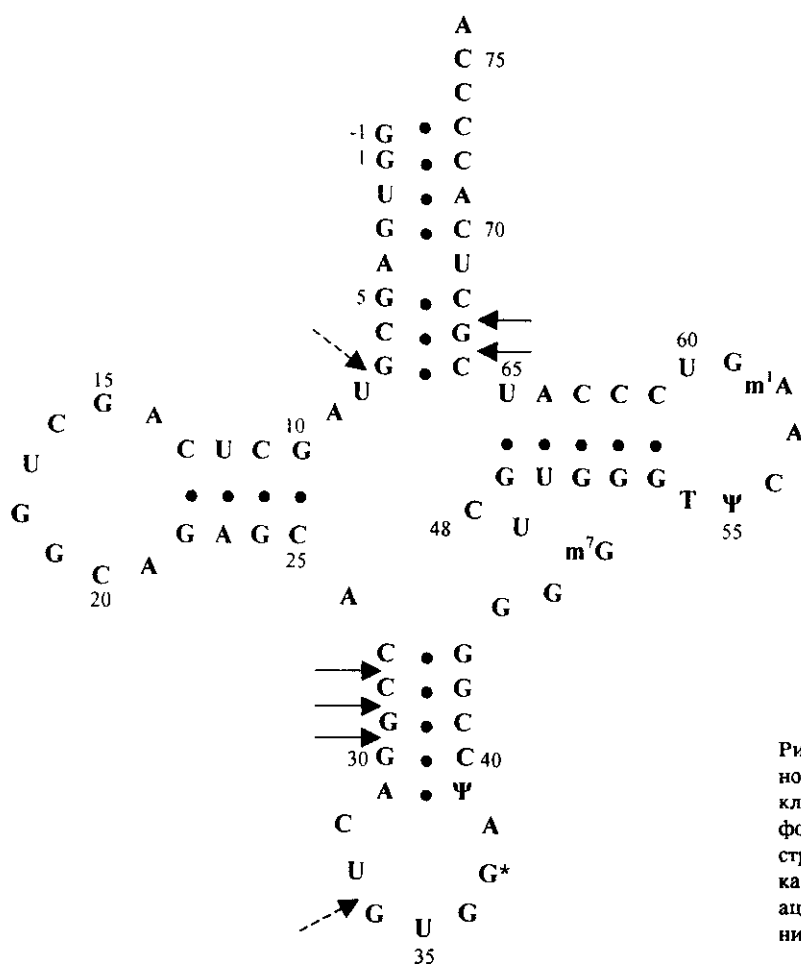


Рис. 6. Нуклеотидная последовательность тРНК^{His} из *T. thermophilus* в виде клеверного листа: стрелками показаны фосфаты тРНК, полностью (сплошная стрелка) и частично (пунктирная стрелка) защищаемые гомологичной аминоацил-тРНК синтетазой от алкилирования этилнитрозомочевинной

Представленные нами результаты по защите остатков фосфорной кислоты тРНК^{His} от химической модификации в присутствии гомологичной синтетазы находятся в хорошем соответствии с предложенной ранее моделью комплекса тРНК^{His} с гистидил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus* [8]. Из этой модели следует, что тРНК^{His} взаимодействует с обеими субъединицами фермента. При этом можно выделить три основные области контактов тРНК с белком: акцепторный стебель тРНК, взаимодействующий с каталитическим доменом фермента; коровая часть тРНК, имеющая контакт с каталитической частью другой субъединицы фермента и, наконец, антикодона ветвь, взаимодействующая с С-концевым доменом белка. В биохимических экспериментах нам не удалось выявить защиту от алкилирования для фосфатов ССА-конца тРНК по причине известных методических ограничений (сложность осаждения этанолом столь коротких фрагментов после реакции алкилирова-

ния). В то же время в акцепторном стебле отчетливо обнаруживается защита фосфатов 67 и 68 (рис. 6). В модели комплекса тРНК^{His} с гистидил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus* остаток фосфорной кислоты 67 взаимодействует с консервативными аминокислотными остатками белка Arg7 и Arg74. На важность такого взаимодействия указывают также данные по мутагенезу, полученные на гистидил-тРНК синтетазе из *E. coli*, где мутация остатка Arg7 приводила к 50-кратному падению K_m для тРНК в реакции аминоацилирования [23]. Остаток фосфорной кислоты 8, частично защищенный гистидил-тРНК синтетазой от алкилирования, согласно модели, должен взаимодействовать с аминокислотными остатками петли 96—98. Наиболее обширной зоной контакта тРНК^{His} с ферментом является антикодона ветвь, где, по нашим биохимическим данным, с белком взаимодействуют остатки фосфорной кислоты 28—30 в антикодона ветви и 34 — в антикодоне. Для взаимодейст-

вия с фосфатами антикодонового стебля в модели комплекса существует кластер положительно заряженных аминокислот [8], образующийся аминокислотными остатками петли $\beta 13$ — $\beta 14$ и остатками, входящими в состав альфа-спирали $\alpha 14$. Для получения более полной картины контактов С-концевого домена с антикодоновым стеблем тРНК^{His}, а также для выяснения деталей взаимодействия этих макромолекул на атомном уровне необходимо получить кристаллографические данные по структуре их комплекса.

O. I. Gudzera, I. A. Krikliviy, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

The isolation of histidine tRNA from *Thermus thermophilus* and the study of its primary structure and interaction sites with homologous aminoacyl-tRNA synthetase

Summary

Histidine tRNAs (tRNA^{His}) are unique in possessing an extra 5'-base (G-1) not found in other tRNAs. To study the molecular mechanisms of tRNA^{His} interaction with histidyl-tRNA synthetase, the method for purification of tRNA^{His} from *T. thermophilus* has been developed and tRNA₁^{His} has been sequenced. tRNA^{His} from *T. thermophilus* was isolated by combination of low-pressure benzoyl-DEAE-cellulose and DEAE Toyopearl 650 chromatographies with HPLC on DEAE 5PW and reversed phase columns. The nucleotide sequence of *T. thermophilus* tRNA₁^{His} has been determined by rapid gel-sequencing method. tRNA₁^{His} from *T. thermophilus* is different from those of *Escherichia coli* at 23 positions. The sites of interaction of tRNA^{His} with histidyl-tRNA synthetase have been studied by the method of chemical modification with ethylnitrosourea. Histidyl-tRNA synthetase protects from modification following phosphates: 8 — between acceptor and D-stems, 27, 28, 29 from 5'-end of anticodon stem, 34 — at the anticodon and phosphates 67, 68 from 3'-end of acceptor stem. All the protected sites of tRNA^{His} are found on one side of three-dimensional structure of tRNA where the variable stem is also located. D-stem is located on the opposite side and does not interact with the enzyme.

Key words: tRNA, aminoacyl-tRNA synthetase, RNA-protein recognition, chemical modification.

O. Й. Гудзера, І. А. Крикливий, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Виділення гістидинової тРНК із *Thermus thermophilus* і вивчення її первинної структури і ділянок взаємодії з гомологічною аміноацил-тРНК синтетазою

Резюме

Структура гістидинових тРНК (тРНК^{His}) відрізняється від структур тРНК інших амінокислотних специфічностей наявністю на 5'-кінці додаткового нуклеотиду (G-1). Для вивчення молекулярних механізмів взаємодії тРНК^{His} з гістидил-тРНК синтетазою розроблено метод очищення тРНК^{His} з *T. thermophilus* і вивчено первинну структуру ізоакцепторної форми тРНК₁^{His}. індивідуальну тРНК^{His} виділяли із сумарної тРНК, використовуючи поєднання хроматографії низького тиску на бензоїлованій ДЕАЕ-целюлозі (БД-целюлоза) і ДЕАЕ Toyopearl 650 з рідинною хроматографією високого тиску на

колонках DEAE 5PW і Ultrapore C8. Первинну структуру тРНК₁^{His} із *T. thermophilus* визначено з використанням методу швидкого гель-секвенування. Вивчена первинна структура відрізняється від тРНК^{His} із *Escherichia coli* за 23 положеннями. Ділянки взаємодії тРНК₁^{His} з *T. thermophilus* із гістидил-тРНК синтетазою досліджували методом хімічної модифікації нітрозоетилсечовиною. Показано, що гістидил-тРНК синтетеза захищає від алкілування нітрозоетилсечовиною такі фосфати тРНК^{His}: 8 — між акцепторною і D-гілкою; 27, 28, 29 — з боку 5'-кінця антикодонової гілки; фосфат 34 — в антикодоні і фосфати 67, 68 — з боку 3'-кінця акцепторної гілки. Усі виявлені ділянки тРНК^{His} локалізуються на одному боці просторової структури тРНК — там, де й варіабельна гілка. D-гілка розташована з протилежного боку і не взаємодіє з ферментом.

Ключові слова: тРНК, аміноацил-тРНК синтетеза, РНК-білкові впізнання, хімічна модифікація.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ibba M., Soll D. Aminoacyl-tRNA synthesis // Annu. Rev. Biochem.—2000.—69.—P. 617—650.
2. Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. tRNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases // The many faces of RNA / Eds D. S. Eggleston, C. D. Prescott, N. D. Pearson.—London: Acad. press, 1998.—P. 55—65.
3. Steinberg S., Misch A., Sprinzl M. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes // Nucl. Acids Res.—1993.—21.—P. 3011—3015.
4. Himeno H., Hasegawa T., Ueda T., Watanabe K., Miura K., Shimizu M. Role of the extra G-C pair at the end of the acceptor stem of the tRNA^{His} in aminoacylation // Nucl. Acids Res.—1989.—17.—P. 7855—7863.
5. Nameki N., Asahara H., Shimizu M., Okada N., Himeno H. Identity elements of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{His} // Nucl. Acids Res.—1995.—23.—P. 389—394.
6. Arnez J. G., Harris D. S., Mitschler A., Rees B., Francklin C. S., Moras D. Crystal structure of histidyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* complexed with histidyl-adenylate // EMBO J.—1995.—14.—P. 4143—4155.
7. Yaremchuk A., Cusack S., Aberg A., Gudzera O., Krikliviy I., Tukalo M. Crystallization of *Thermus thermophilus* histidyl-tRNA synthetase and its complex with tRNA^{His} // Proteins: structure, function and genetics.—1995.—22.—P. 426—428.
8. Aberg A., Yaremchuk A., Tukalo M., Rasmussen B., Cusack S. Crystall structure analysis of the activation of histidine by *Thermus thermophilus* histidyl-tRNA synthetase // Biochemistry.—1997.—36.—P. 3084—3094.
9. Yaremchuk A., Tukalo M., Grotli M., Cusack S. A succession of substrate induced conformational changes ensures the amino acid specificity of *Thermus thermophilus* prolyl-tRNA synthetase: comparison with histidyl-tRNA synthetase // J. Mol. Biol.—2001.—309.—P. 989—1002.
10. Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1962.—8.—P. 1—3.
11. Bruce A. G., Uhlenbeck O. S. Reactions at the termini of the tRNA with T4 RNA ligase // Nucl. Acids Res.—1978.—5.—P. 3665—3677.
12. Silberklang M., Gillum A. M., Raj Bhandary U. L. The use nuclease P1 in sequence analysis of end group labeled tRNA // Nucl. Acids Res.—1977.—4.—P. 4091—4108.
13. Rether B., Bonnet J., Ebel J. P. Studies on tRNA nucleotidyl-transferase from baker's yeast. 1. Purification of the enzyme.

- Protection against thermal inactivation and inhibition by several substrates // *Eur. J. Biochem.*—1974.—50.—P. 281—288.
14. *Vlasov V. V., Giege R., Ebel J. P.* Tertiary structure of tRNA in solution monitored phosphodiester modification with ethylnitrosourea // *Eur. J. Biochem.*—1981.—119.—P. 51—59.
 15. *Peattie D. A.* Direct chemical method for sequencing RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76.—P. 1760—1764.
 16. *Lockard R. E., Alzner-Debveerd B., Heckman J. E., Mac-Gee J., Tabor M. W., Raj Bhandary U. L.* Sequence analysis of 5' $\{^{32}\text{P}\}$ labeled mRNA and tRNA using polyacrylamide gel electrophoresis // *Nucl. Acids Res.*—1978.—5.—P. 37—56.
 17. *Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W.* Mapping adenines, guanosines and pyrimidines in RNA // *Nucl. Acids Res.*—1977.—4.—P. 2527—2538.
 18. *Vlasov V. V., Korn D., Giege P., Ebel J.-P.* Protection of phosphodiester bonds in yeast tRNA^{Val} by its cognate aminoacyl-tRNA synthetase against alkylation by ethylnitrosourea // *FEBS Lett.*—1981.—123.—P. 277—281.
 19. *Остерман Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот.—М.: Наука, 1985.—536 с.
 20. *Arnez J. G., Moras D.* Structural and functional consideration of the aminoacylation reaction // *TIBS.*—1997.—22.—P. 211—216.
 21. *Bovee M. L., Yan W., Sproat B. S., Franclyn C. S.* tRNA discrimination at the binding step by a class II aminoacyl-tRNA synthetase // *Biochemistry.*—1999.—38.—P. 13725—13735.
 22. *Rudinger J., Puglisi J. D., Putz J., Schatz D., Eckstein F., Florentz C., Giege R.* Determinant nucleotides of yeast tRNA(Asp) interact directly with aspartyl-tRNA synthetase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1992.—89.—P. 5882—5886.
 23. *Hawko S. A., Franclyn C. S.* Covariation of a specificity-determining structural motif in an aminoacyl-tRNA synthetase and a tRNA identity element // *Biochemistry.*—2001.—40.—P. 1930—1936.

УДК 577.217.335

Надійшла до редакції 08.02.06