

Первичная структура тРНК^{Ser} из *Thermus thermophilus*

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

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

Изучена первичная последовательность двух изоакцепторных тРНК^{Ser} из T. thermophilus, содержащих различные антикодоны. При сравнении первичных последовательностей было установлено, что гомология составляет 60%. Основные отличия наблюдаются в переменных ветвях, в то время как акцепторные стебли и T-ветви полностью идентичны, а D-ветви отличаются лишь одной парой нуклеотидов.

Введение. Интерес к сравнительному изучению первичных последовательностей тРНК^{Ser} из *T. thermophilus* вызван несколькими причинами. Прежде всего, из литературы известно, что в процессе аминокислотирования тРНК^{Ser} узнавание ее гомологичной аминокислоты тРНК синтетазой реализуется специфическим кодоннезависимым способом [1]. Такое кодоннезависимое узнавание характерно только для тРНК^{Leu} и тРНК^{Ser}, относящихся ко II структурному классу [1—4], а также для тРНК^{Ala}, относящейся к I классу тРНК с короткой переменной петлей [5]. Кроме того, для тРНК^{Ser} *Escherichia coli* показано, что важную роль в процессе узнавания серил-тРНК синтетазой играет пространственная структура тРНК, при этом особое внимание уделяется структуре D-ветви и переменной петле [1]. Следует отметить также, что, согласно генетическому коду, аминокислоте серину соответствуют шесть различных кодонов. В связи с этим было бы интересно сравнить нуклеотидные последовательности изоакцепторных тРНК^{Ser} с различными антикодонами, что может служить основой для дальнейших исследований пространственных структур этих тРНК и изучения участков взаимодействия с гомологичной аминокислот-тРНК синтетазой.

Другой причиной являются экстремальные ус-

ловия обитания *T. thermophilus* — горячие источники с температурой воды 60—85 °С, поэтому кажется вероятным, что макромолекулы этого организма могут иметь свои структурные особенности. В частности известно, что молекулы тРНК из *T. thermophilus* более термостабильны, чем аналогичные молекулы из *E. coli* [6—9]. Расшифровка первичных структур нескольких тРНК из *T. thermophilus* показала, что наличие набора трех модифицированных оснований: s²T и m¹A в T-петле и Gm в D-петле может быть причиной более высокой термостабильности этих молекул [10, 11].

Материалы и методы. тРНК₁^{Ser} и тРНК₂^{Ser} получали из суммарного препарата тРНК *T. thermophilus* в несколько стадий: хроматография на колонке с БД-целлюлозой, дальнейшая очистка на колонках с DEAE 5PW и СЗ с использованием оборудования для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) «Gold System» («Beckman», Австрия). Чистоту полученной тРНК определяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 8 М мочевины.

В экспериментах использовали РНК-лигазу (КФ 6. 5. 1. 3), полинуклеотидкиназу (КФ 2. 7. 1. 78), выделенную из клеток *E. coli*, инфицированных фагом T4 («Pharmacia», Швеция), T₁-РНКазу (КФ 3. 1. 27. 3; «Sankyo», Япония); щелочную фосфатазу из *E. coli* (КФ 3. 1. 3. 1; «Sigma», США), щелочную фосфатазу кишок телят (3. 1. 3. 1, «Boehringer», ФРГ); [α -³²P]АТР, удельная

© З. М. ПЕТРУШЕНКО, О. П. КОВАЛЕНКО, Н. Н. МАЛЬЧЕНКО,
И. А. КРИКЛИВЫЙ, А. Д. ЯРЕМЧУК, М. А. ТУКАЛО, 1997

активность 3000 Ки/ммоль, ³²P-цитидиндифосфат, удельная активность 3000 Ки/ммоль («Amersham», Англия).

тРНК₁^{Ser} и тРНК₂^{Ser}, ³²P-меченную по 3'- и 5'-концу, получали, как описано в работах [11] и [12] соответственно.

Нуклеотидную последовательность тРНК^{Ser} определяли методом быстрого гель-секвенирования с использованием диметилсульфата, гидразина («Fluka», Швейцария), диэтилпирокарбоната («Merck», ФРГ), как в работе [13], а также методом гидролиза нуклеазами T₁, U₂, Pfu M, *Bacillus cereus* и CL 3 («Pharmacia», [15]).

Модифицированные основания тРНК^{Ser} определяли следующим образом: 1) гидролизовали 20 мкг

тРНК T₁-РНКазой и разделяли полученные фрагменты тРНК на микроколонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации NaCl при нейтральном pH в присутствии 7 М мочевины; 2) рехроматографировали олигонуклеотиды на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте NaCl при pH 3,5 в присутствии 7 М мочевины с одновременной детекцией поглощения материала по длинам волн 250, 260, 270, 280, 290, 330 нм на ультрамикроспектрофотометре «Милюхром 1А», ПО «Научприбор», Россия) [16]; 3) обессоливали разделенные нуклеотиды на колонке с DEAE-целлюлозой в триэтиламмонийбикарбонатном буфере; 4) гидролизовали олигонуклеотиды нуклеазой А, фосфодиэстеразой змеиного яда, щелочной фосфатазой кишечника телянка; 5)

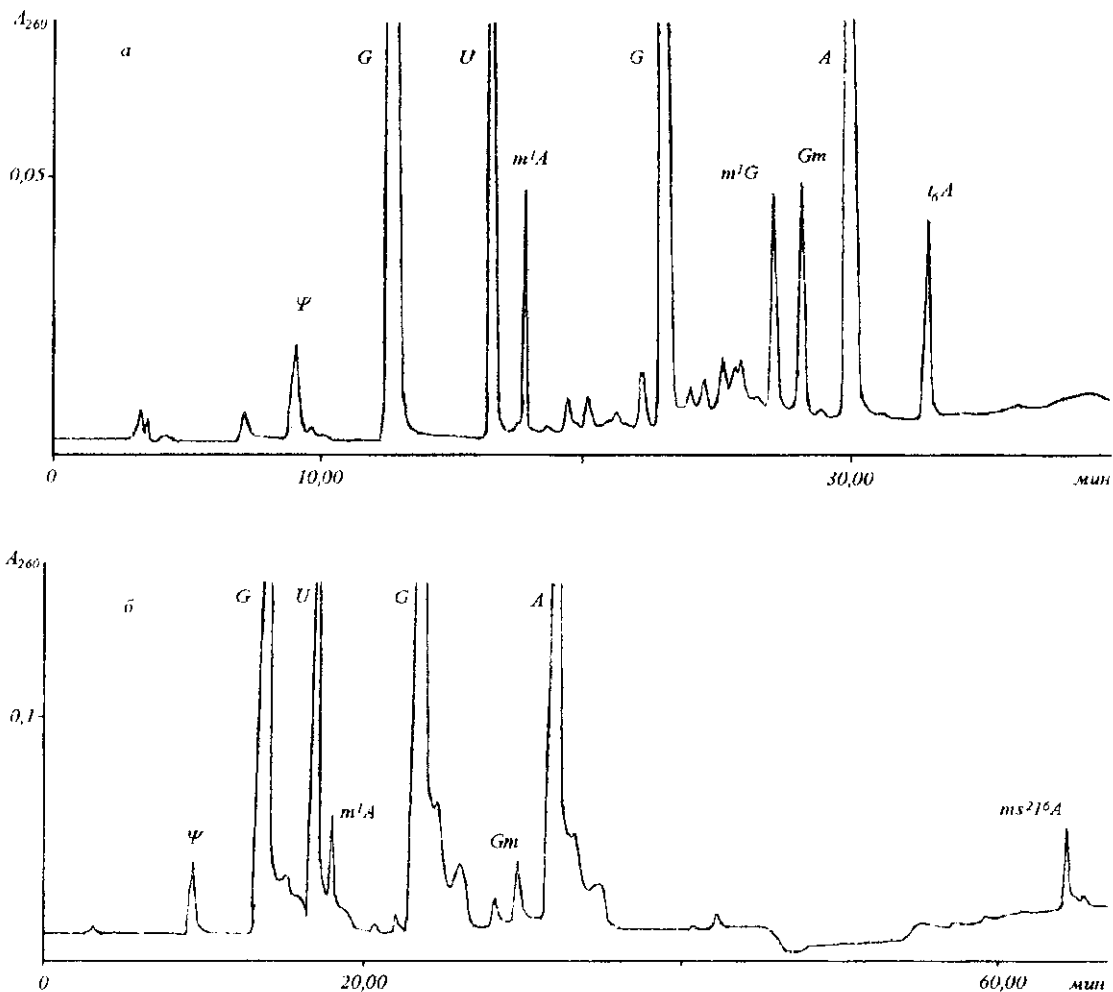


Рис. 1. Разделение нуклеозидов тРНК₁^{Ser} (а) и тРНК₂^{Ser} (б) на колонке С18 с использованием ВЭЖХ

полученные нуклеозиды разделяли на колонке С18 с применением Gold System [17].

Результаты и обсуждение. Нуклеотидные последовательности тРНК₁^{Ser} и тРНК₂^{Ser} были определены при использовании как химических реагентов, так и набора нуклеаз, специфичных к различным основаниям в тРНК [14, 15]. Для более точного анализа проведено несколько экспериментов с разделением меченых олигонуклеотидов в 10, 12,5 и 20 %-м ПААГ (результаты не представлены).

Минорные основания молекул исследовали с помощью ВЭЖХ [17] с использованием колонки С18 (рис. 1). Из этого рисунка видно, что, кроме четырех главных азотистых оснований, тРНК₁^{Ser} в своем составе содержит минорные основания: Ψ, m¹A, m¹G, Gm, i⁶A; а тРНК₂^{Ser} — основания Ψ, m¹A, Gm и ms²i⁶A. Вид минорного компонента тРНК определяли как по времени элюции с колонки, так и по спектральным характеристикам.

Чтобы определить место расположения моди-

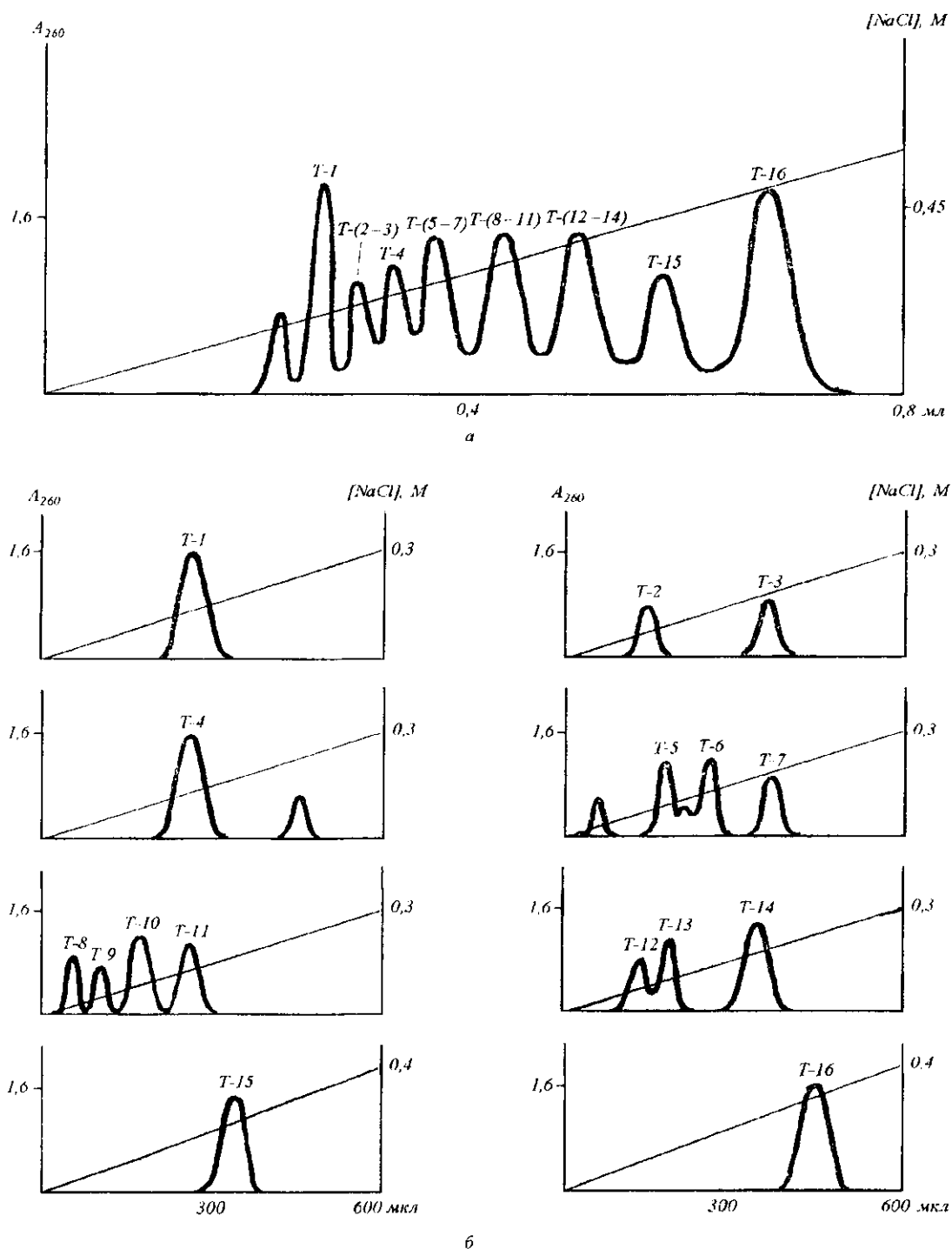
фицированного основания в молекуле нами был проведен гидролиз тРНК T₁-нуклеазой. Полученные олигонуклеотиды были разделены по длине (при нейтральном рН), а затем по заряду (при кислом рН) на микроколонке с DEAE-целлюлозой с детекцией поглощения материала по шести длинам волн на ультрамикроспектрофотометре «Милхром» (рис. 2, 3). Нуклеозидный состав каждого олигонуклеотида определяли с помощью ВЭЖХ после обработки его нуклеазой А, фосфомоноэстеразой и фосфодиэстеразой змеиного яда (таблица). В ходе этих экспериментов были выявлены еще два минорных основания: s²T и D, которые не были обнаружены при разделении нуклеозидов целой тРНК при ВЭЖХ. Дигидроуридин обнаружен во фрагментах Т-6 (см. рис. 2) и Т-5 (см. рис. 3) по методике, описанной в работе [13].

На основании данных, полученных методами быстрого гель-секвенирования, ВЭЖХ и микроколоночной хроматографии, можно полностью реконструировать первичные структуры тРНК₁^{Ser} и

Определение последовательности оснований в олигонуклеотидах полного T₁-РНКазного гидролизата тРНК₁^{Ser} и тРНК₂^{Ser}

Фракция	Олигонуклеотид	
	тРНК ₁ ^{Ser}	тРНК ₂ ^{Ser}
Т-1	Gp	Gp
Т-2	CpGp	CpGp
Т-3	UpGp	UpGp
Т-4	CpCpGp	CpCpGp
Т-5	UpUpGp{	UpUpGp
Т-6	CpDpGp	CpDpGp
Т-7	UpGmpGp	UpGmpGp
Т-8	ApApGp	ApApGp
Т-9	s ² TrΨpCpGp	ApApGp
Т-10	CpApCpCpGp	CpUpApGp
Т-11	m ¹ ApApUpCpCpCpGp	s ² TrΨpCpGp
Т-12	CpUpi ⁶ ApApGp	ApCpApCpGp
Т-13	CpApCpCpCpUpGp	m ¹ ApApUpCpCpCpGp
Т-14	ApApApApCpCpGp	ms ² i ⁶ ApApApΨpCpGp
Т-15	CpCpCpUpCpUpCpCpGp	CpCpCpUpCpUpCpCpUp
Т-16	—	CpUpUpApApApCpCpUpCpCpCpUpCpCpGp

П р и м е ч а н и е. Gp — GMP; I — псевдоуридин; D — дигидроуридин; m¹A-1 — метиладенозин; i⁶A — N-((9-β-D-рибофуранозилпурино-6-ил)карбамоил)треонин; m¹G — метилгуанозин; Gm — 2'-O-метилгуанозин; s²T — 5-метил-2-тиоуридин; ms²i⁶A — 2-метилтио-N⁶-изопентил-аденозин



6

Рис. 2. Хроматография исчерпывающего T₁-РНКазного гидролизата rPHK₁^{Ser} из *T. thermophilus* (0,5 OE₂₆₀) на DEAE-целлюлозе (колонка 0,5 × 70 мм) в линейном градиенте концентрации NaCl в присутствии 7 М мочевины, pH 7,5 (а); рехроматография отдельных фракций (б). Фракции T-(1—8) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой размером 0,5 × 50 мм, а T-(9—15) — на колонке размером 0,5 × 70 мм в присутствии 7 М мочевины при pH 3,7

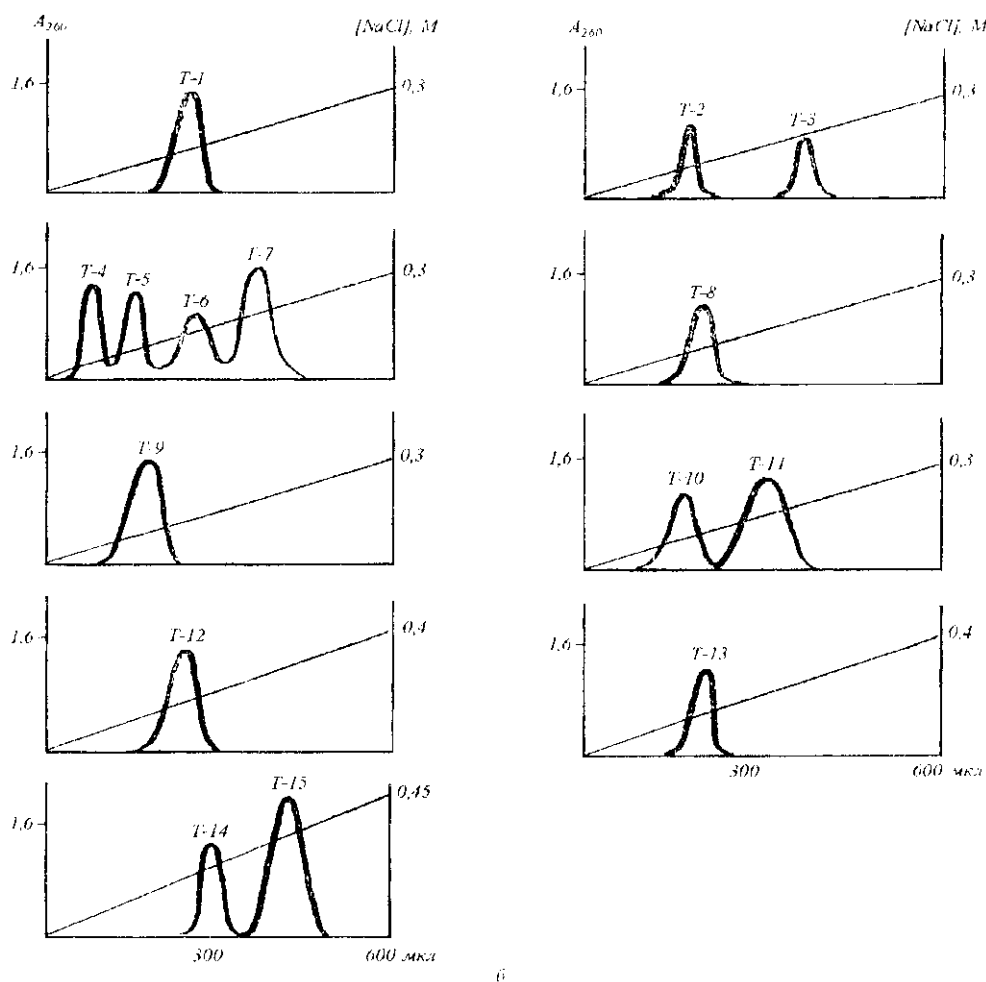
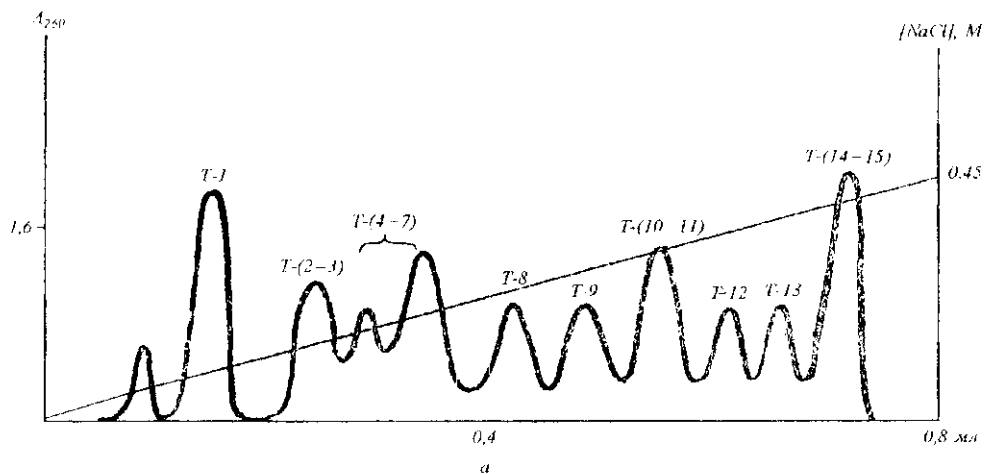


Рис. 3. Хроматография исчерпывающего T_1 -РНКазного гидролизата $tRNK_2^{Ser}$ из *T. thermophilus* ($0,5 O_{E_{260}}$) на DEAE-целлюлозе (колонка $0,5 \times 70$ мм) в линейном градиенте концентрации NaCl в присутствии 7 М мочевины, pH 7,5 (а); рехроматография отдельных фракций (б). Фракции T-(1—7) рехроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой размером $0,5 \times 50$ мм, а T-(8—16) — на колонке размером $0,5 \times 70$ мм в присутствии 7 М мочевины при pH 3,7

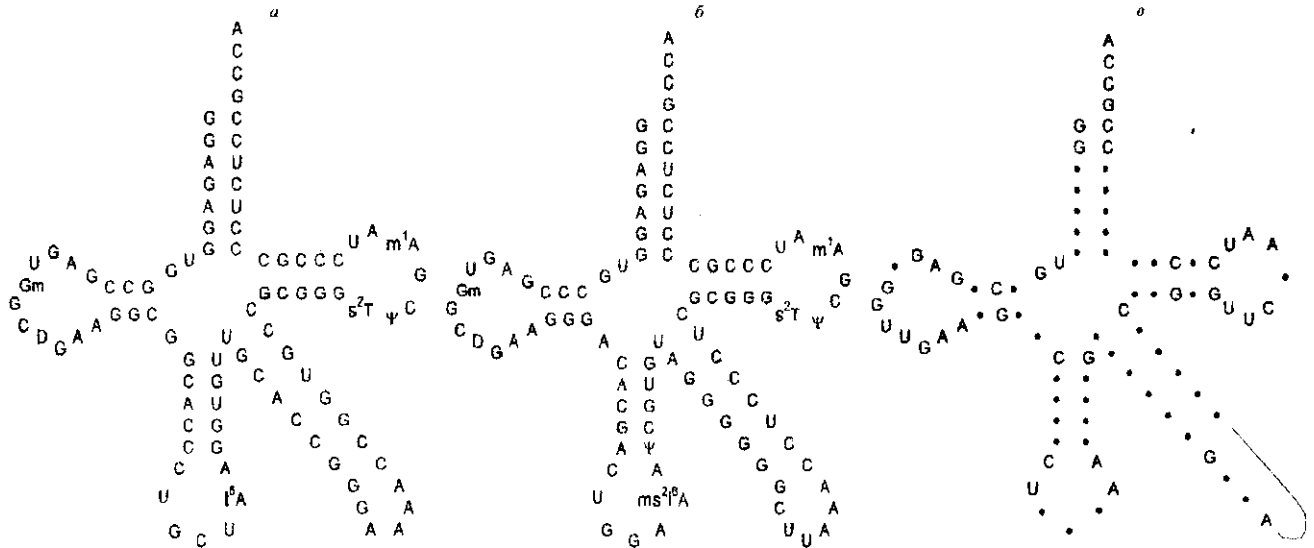


Рис. 4. Структура тРНК₁^{Ser} (а) и тРНК₂^{Ser} (б) из *T. thermophilus* в виде клеверного листа; в — структура тРНК^{Ser} *E. coli* [20]. Модификации оснований не учитываются. Обозначены нуклеотиды, абсолютно консервативные для тРНК серинового семейства. Точками обозначены места вариаций сиквенса. тРНК^{Ser} имеют различное количество нуклеотидов в переменном районе, что показано сплошной линией

тРНК₂^{Ser} из *T. thermophilus* (рис. 4). тРНК₁^{Ser} состоит из 93 нуклеотидов, тРНК₂^{Ser} — из 94. Каждая тРНК содержит по семь модифицированных оснований. Местоположение m¹G в структуре тРНК₁^{Ser} нами не определено, но, опираясь на литературные данные о расположении модифицированных оснований в структуре тРНК [18], мы предполагаем, что m¹G находится в положении 9. Остальные минорные компоненты находятся в положениях, идентичных для обеих тРНК, кроме ψ 39. В тРНК₁^{Ser} в положении 39 расположен гауозин.

Как видно, обе тРНК имеют те же особенности первичной структуры, что и ранее изученные тРНК, выделенные из *T. thermophilus*, а именно: наличие Gm, s²T и m¹A.

Следует отметить, что представленная структура тРНК₂^{Ser} не совпадает с ранее опубликованными данными о последовательности гена этой тРНК [19], однако корректности нашей структуры подтверждена независимыми исследованиями структуры гена тРНК₂^{Ser} (Тукало и др., неопубликованные результаты).

На рис. 4 представлены структуры тРНК₁^{Ser} и тРНК₂^{Ser} в виде клеверного листа. Как следует из этого рисунка, акцепторные стебли и Т-ветви полностью идентичны. D-ветви отличаются только инвертированной парой 10·25. В положении 26 обеих

тРНК находится пурин, но в тРНК₁^{Ser} это гуанозин, а в тРНК₂^{Ser} — аденозин.

Наибольшие отличия затрагивают антикодонные стебли и переменные ветви, причем последние различаются не только нуклеотидной последовательностью, но и длиной (19 нуклеотидов в тРНК₁^{Ser} и 20 — в тРНК₂^{Ser}). Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными при изучении структурных основ дискриминации между тРНК II класса из *E. coli* [1]. Согласно выводам, сделанным в этой работе, для специфического узнавания тРНК^{Ser} серил-тРНК синтетазой необходимо наличие переменного стебля длиной не менее чем 4 пары оснований, при этом нуклеотидная последовательность всей переменной ветви не важна. Различия в последовательностях антикодонных ветвей еще раз подтверждают необязательное их участие в процессах взаимодействия и узнавания серил-тРНК синтетазой.

Из рис. 4 видно хорошее соответствие между первичными структурами тРНК₁^{Ser} и тРНК₂^{Ser} из *T. thermophilus* и «усредненной» последовательностью сериновых тРНК из *E. coli* [20]. Участки гомологии затрагивают в основном структурные элементы, участвующие в создании L-формы молекулы. Это указывает на то, что в клетках *T. thermophilus* процесс узнавания тРНК^{Ser} серил-тРНК синтетазой

происходит аналогичным образом при определяющей роли пространственной структуры тРНК, что хорошо согласуется с данными по структуре комплекса тРНК^{Ser} с серил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus*, изученного методом рентгеноструктурного анализа [21, 22].

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

Первичная структура тРНК^{Ser} з *Thermus thermophilus*

Резюме

Вивчено нуклеотидні послідовності двох ізоакцепторних тРНК^{Ser} із *T. thermophilus*, які мають різні антикодони. При порівнянні нуклеотидних послідовностей було встановлено, що гомологія складає 60 %. Основні відмінності стосуються структури варіабельних та антикодонних гілок, у той час як акцепторні стебла та Т-гілки повністю ідентичні, а Д-гілки відрізняються лише однією парою нуклеотидів.

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

The primary structure of tRNA^{Ser} from *Thermus thermophilus*

Summary

Sequences of two serine isoacceptor tRNAs from *Thermus thermophilus*, containing different anticodons have been studied. The homology of sequences is 60 %. The major differences have been found in anticodon and variable arms. Acceptor stems and T-arms have the same structures and D-arms differ by only one base pair.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Asahara H., Himeno H., Tamura K. et al. *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^{Ser} by its characteristic tertiary structure // *J. Mol. Biol.*—1994.—236.—P. 738—748.
- Asahara H., Himeno H., Tamura K. et al. Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA^{Leu} and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser} and tRNA^{Tyr} // *Ibid.*—1993.—231.—P. 219—229.
- Петрушенко З. М., Тукало М. А., Гудзера О. И. и др. Определение участков взаимодействия тРНК^{Leu} молочной железы коров с гомологичной аминоацил-тРНК синтетазой методом химических модификаций // *Биоорг. химия.*—1990.—16.—С. 1647—1652.
- Dietrich A., Romby P., Marechal-Drouard L. et al. Solution conformation of several free tRNA^{Leu} species from bean, yeast and *Escherichia coli* and interaction of these tRNAs with bean cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase. A phosphate alkylation study with ethylnitrosourea // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18.—P. 2589—2597.
- Tamura K., Asahara H., Himeno H. et al. Identity elements of *E. coli* tRNA^{Ala} // *J. Mol. Recogn.*—1991.
- Davanloo P., Sprinzl M., Watanabe K. et al. Role of ribthymidine in the thermal stability of transfer RNA as monitored

- by proton magnetic resonance // *Nucl. Acids Res.*—1979.—6.—P. 1571—1581.
- Oshima T., Sakaki Y., Wakayama N. et al. // *Experientia.*—26, Suppl.—P. 317—331.
- Watanabe K., Oshima T., Iijima K. et al. Purification and thermal stability of several amino acid-specific tRNAs from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8 // *J. Biochem. (Tokyo).*—1980.—87, N 1.—P. 1—13.
- Watanabe K., Oshima T., Nishimura S. CD spectra of 5-methyl-2-thiouridine in tRNA^{Met} from extreme thermophile // *Nucl. Acids Res.*—1976.—3.—P. 1703—1713.
- Horie N., Hara-Yokoyama M., Yokoyama S. et al. Two tRNA^{Ile} species from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8: effect of 2-thiolation of ribothymidine on the thermostability of tRNA // *Biochemistry.*—1985.—24.—P. 5711—5715.
- Watanabe K., Kuchino Y., Yamaizumi Z. et al. // *J. Biochem. (Tokyo).*—1979.—86.—P. 893—905.
- Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. Reaction at termini RNA with T4 RNA ligase // *Nucl. Acids Res.*—1978.—5, N 10.—P. 111—121.
- Венкстери Т. В. Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот.—М.: Наука, 1970.—258 с.
- Peattie D. A. Direct chemical method for sequencing RNA/OO // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76, N 4.—P. 1760—1764.
- Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA // *Nucl. Acids Res.*—1977.—4, N 8.—P. 2527—2538.
- Власов В. В., Грачев М. А., Комарова И. И. и др. Ионообменная хроматография и спектральный анализ олигонуклеотидов в микромасштабе // *Молекуляр. биология.*—1972.—6, № 6.—С. 808—816.
- Gehrke C., Kuo K. Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.*—1989.—471, N 1.—P. 3—36.
- Sprinzl M. M., Dank N., Nock S., Schon A. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes // *Nucl. Acids Res.*—1991.—19, Suppl.—P. 2127—2171.
- Venegas A. T. *Thermophilus* HB8 tRNA^{Ser} gene // EMBL data bank entry X07394.—1988.
- 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—6818.
- 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.—P. 1404—1410.
- Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. The crystal structure of the ternary complex of *Thermus thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA^{Ser} and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site // *The EMBO J.*—1996.—15, N 11.—P. 2834—2842.

УДК 577.113.5

Поступила в редакцию 27.05.97