



Структура и функция биополимеров

УДК 577.217.335

Л. Г. Калачнюк, М. А. Тукало, Г. Х. Мацука

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТКОВ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ, УЧАСТВУЮЩИХ В ОБРАЗОВАНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ тРНК_{1^{Ser}} ПЕЧЕНИ БЫКА

Участие остатков фосфорной кислоты в образовании третичной структуры тРНК_{1^{Ser}} печени быка, принадлежащей к классу тРНК с длинной переменной петлей, исследовали с помощью нитрозоэтилмочевины. Показано, что низкий уровень модификации имеют следующие фосфаты: 8, 9, 11 (на изгибе молекулы между акценторным и D-стеблями); 21 (D-петля); 47G, 47I и 49 (переменная ветвь); 58, 59 (T-петля). Методами химической модификации доказана экспонированность в раствор переменной ветви тРНК_{1^{Ser}} печени быка.

Введение. В изучении процесса биосинтеза белка одно из центральных мест принадлежит проблеме узнавания тРНК соответствующей аминоксил-тРНК синтетазой (АРСазой). Несмотря на огромное количество исследований, посвященных взаимодействию тРНК и АРСаз, остается ряд проблем, требующих дальнейшего изучения [1, 2]. При анализе взаимодействия тРНК и АРСазы необходима информация об их первичной и пространственной структуре. Наиболее широкие сведения при сравнении пространственных структур молекул тРНК можно получить, используя химические соединения, модифицирующие остатки фосфорной кислоты (фосфаты) [3, 4]. Кроме того, метод модификации тРНК нитрозоэтилмочевинной очень прост в исполнении, высокочувствителен при использовании в варианте быстрого гель-секвенирования и позволяет количественно охарактеризовать уровень модификации фосфата.

В связи с этим мы провели серию экспериментов, целью которых было определение с помощью метода химической модификации нитрозоэтилмочевинной остатков фосфорной кислоты, участвующих в образовании пространственной структуры тРНК_{1^{Ser}} печени быка. Первичная структура тРНК_{1^{Ser}} печени быка установлена нами ранее [5].

Материалы и методы. Препарат индивидуальной тРНК_{1^{Ser}} выделяли из суммарной тРНК печени быка методами, описанными ранее [6].

Нитрозоэтилмочевина любезно предоставлена сотрудником Ин-та молекуляр. биологии и генетики АН Украины А. Г. Терентьевым. В работе использовали (α -³²P)АТР и (γ -³²P)АТР с удельной активностью 80 и 40 ПБк/моль соответственно («Радиопрепарат», ИЯФ АИ Узбекистана), щелочную фосфатазу *Escherichia coli* (КФ 3.1.3.1, «Worthington», США), Т1-РНКазу (КФ 3.1.27.3, «Sankyo», Япония), полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), выделенную из *E. coli*, инфицированную фагом Т4 («Phagmasia», Швеция), тРНК-нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.2.1) из дрожжей, любезно предоставленную Р. Жижке (Ин-т молекуляр. и клеточ. биологии, Страсбург).

© Л. Г. Калачнюк, М. А. Тукало, Г. Х. Мацука, 1992

тРНК₁^{ser} метили по 3'- и 5'-концевым остаткам в соответствии с работами [3, 7].

Частичный гидролиз тРНК Т1-РНКазой осуществляли, как в работе [8].

Алкилирование меченой тРНК₁^{ser} нитрозоэтилмочевинной проводили в двух экспериментальных условиях — стабилизирующих пространственную структуру молекулы (0,3 М какодилат натрия, pH 8,0, содержащий 0,02 М MgCl₂, 0,1 М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 23 °С в течение 2,5 ч) и денатурирующих ее (0,3 М какодилат натрия, pH 8,0, 2 мМ ЭДТА, 72 °С, 2 мин). В обоих случаях нитрозоэтилмочевину добавляли в реакционную смесь в виде насыщенного раствора в этаноле: 5 мкл раствора реагента к 20 мкл буферного раствора, содержащего 0,4 мкг тРНК₁^{ser}, меченой по одному из концов. В контрольных экспериментах насыщенный раствор реагента заменен чистым этанолом.

После алкилирования в реакционную смесь добавляли 10 мкг суммарной тРНК, раствор подкисляли 1,5 М ацетатом натрия (pH 5,0) и тРНК осаждали спиртом. Полинуклеотидную цепь по модифицированным остаткам расщепляли, как описано в [4]. Образцы гидролизованной тРНК анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ, 12,5 %-й) в 0,05 М трис-боратном буфере (pH 8,3), содержащем 1 мМ ЭДТА и 8 М мочевины. Электрофоретические полосы идентифицировали, сравнивая их подвижность с подвижностью фрагментов тРНК₁^{ser}, полученных путем частичного гидролиза рибонуклеазой Т1. Радиоавтографы гелей сканировали с помощью микроденситометра фирмы «Goussé Loebler» (Англия).

Результаты и обсуждение. Доступность фосфатов тРНК₁^{ser} для алкилирования нитрозоэтилмочевинной исследовали в условиях, обеспечивающих нативную структуру молекул, и в денатурирующих условиях. Полученные фрагменты анализировали гель-электрофорезом (рис. 1). В процессе обработки тРНК после модификации обычно применяется осаждение этанолом, что приводит к неполному выделению коротких фрагментов полинуклеотидов. Поэтому получить данные о модификации фосфатов вблизи концов нуклеотидной цепи тРНК не представляется возможным (обычно первые 7—8 фосфатов). В положениях 17, 44 тРНК₁^{ser} содержатся остатки 2'-О-метилрибозы, препятствующие расщеплению соответствующих фосфотриэфиров. Это не дает возможности судить о степени модификации в данных участках молекулы. Поскольку степень модификации тРНК нитрозоэтилмочевинной в использованных условиях была низкой, уровень модификации фосфатов тРНК и интенсивность соответствующих электрофоретических полос должны быть прямо связаны с реакционными способностями фосфатов в неповрежденной модификацией структуре тРНК, существующей в условиях алкилирования. Количественная обработка результатов заключалась в определении интенсивности полос с помощью сканирующего денситометра, что позволяло оценить степень расщепления по каждому из фосфатов тРНК и, следовательно, уровень модификации этих фосфатов. При алкилировании тРНК₁^{ser} в денатурирующих условиях все фосфаты в ее составе реагируют с близкими скоростями, а слабые отличия в реакционных способностях различных фосфатов, наблюдаемые при этом, скорее всего, отражают влияние соседних оснований.

Отношение интенсивностей электрофоретических полос, соответствующих расщеплению по одноименным фосфатам тРНК₁^{ser}, алкилированной в стабилизирующих пространственную структуру тРНК условиях, а также денатурирующих ее, представлены на рис. 2. Данные величины показывают отличия в реакционной способности фосфатов в нативной тРНК₁^{ser} и в денатурированной молекуле.

Известно, что основной причиной снижения реакционной способности фосфатов в составе тРНК является их пространственное экранирование от реагента, происходящее за счет их участия во взаимодействиях, формирующих третичную структуру тРНК. Проанализиро-

вав кривую расчета денситограмм, было определено, что при алкилировании тРНК₁^{ser} нитрозоэтилмочевиной в условиях, когда полимер имеет нативную структуру, низкий уровень модификации имеют следующие фосфаты: 8, 9, 11, 21, 47G, 47I, 49, 56, 58, 59. На рис. 2 представлено также расположение этих

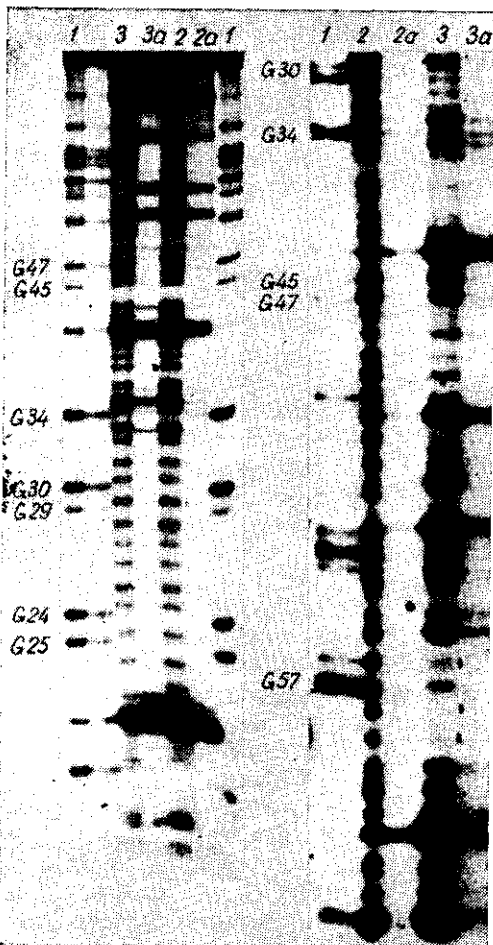


Рис. 1. Радиоавтограф 12,5 %-го ПААГ с разделением фрагментов 5'- (а), 3'-меченной (б) тРНК₁^{ser}, полученных в результате гидролиза молекул, алкилированных нитрозоэтилмочевиной в денатурирующих условиях (2) и в условиях, стабилизирующих пространственную структуру (3): 2а, 3а — гидролизаты контрольной инкубации тРНК₁^{ser} в отсутствие реагентов, 1 — тРНК₁^{ser}, частично гидролизованная РНКазой Т1

фосфатов в структуре тРНК₁^{ser}. Из результатов анализа алкилирования различных тРНК с помощью нитрозоэтилмочевины [2—4, 7] и наших данных видно, что во всех тРНК низкий уровень модификации имеют фосфаты 8, 9, 18, 58, 59. Это свидетельствует о возможной их общей роли в организации макроструктуры молекулы. Наши исследования и работы других авторов, изучавших участие фосфатов в формировании пространственной структуры тРНК [3, 4, 7, 9], под-

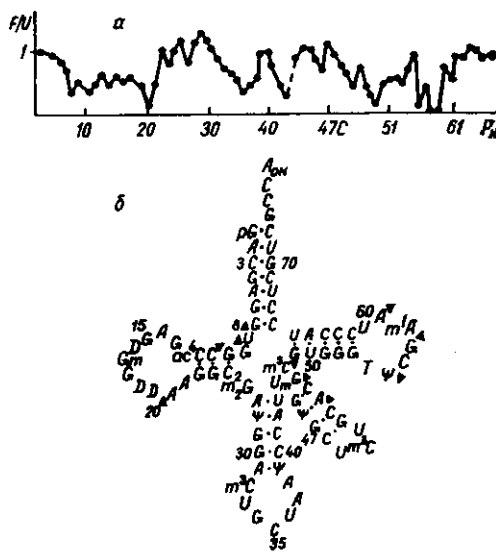


Рис. 2. Относительные реакционные способности фосфатов тРНК₁^{ser} — а: F/U — отношение интенсивностей соответствующих электрофоретических полос электрофореграмм опытов по алкилированию тРНК в условиях, стабилизирующих нативную структуру молекулы и денатурирующих ее (P_n — номера фосфатов); б — структура тРНК₁^{ser} в виде клеверного листа (треугольниками обозначены фосфаты с низким уровнем модификации в условиях, стабилизирующих нативную структуру молекулы)

тверждают взаимодействие фосфатов 8, 9, 18, 21, 58, 59 с ионами магния, стабилизирующими третичную структуру тРНК.

Таким образом, о месте связывания иона магния в антикодоновой петле тРНК свидетельствует наблюдавшееся уменьшение реакционной способности фосфата в положении 36 тРНК₁^{ser}. А фосфаты в положениях 47G, 47I и 49 являются, по-видимому, основными структурными элементами молекулы тРНК₁^{ser}, поддерживающими определенное положение длинной переменной ветви.

Рассмотрев экспериментальные данные по химической модификации нитрозоэтилмочевиной [3, 4, 7, 9], можно проследить сходство

структурной организации всех тРНК. Это не удивительно, так как тРНК, проходящие через рибосомный аппарат, должны иметь похожие структурные характеристики. Но результаты этих же опытов показывают и отличия пространственных структур тРНК, зависящие, вероятно, от специфичности узнавания тРНК соответствующей АРСазой. Авторы [3, 4], считают, что различия, возможно, определяются организацией D-петель. Разная длина L- и D-участков должна предполагать различное расположение постоянной последовательности G — G ТФС-петлями. По-видимому, существует взаимосвязь отличий между активностью фосфатов тРНК^{Phe} и других тРНК в участках ТФС-ветви и отличиями в последовательности нуклеотидов D-петли в этих тРНК [4]. Итак, по данным определения реакционных способностей фосфатов тРНК, можно идентифицировать те из них, которые взаимодействуют с ионами магния или образуют водородные связи. В таких взаимодействиях участвует небольшая часть фосфатов молекулы тРНК, и большинство фосфатов реагирует с нитрозоэтилмочевинной в нативном полимере.

Таким образом, наши данные и данные литературы [3, 4, 7, 9] указывают на общность укладки рибозофосфатного остова тРНК_{IAG}^{Leu} и тРНК_{IAG}^{ser} с длинной дополнительной петлей и остова тРНК, имеющих короткую переменную петлю. Различия же касаются структуры переменной ветви, экспонированной в раствор и образующей дополнительные третичные взаимодействия.

Summary. The phosphates of the tRNA_{IAG}^{ser} from bovine liver (tRNA which has a long variable loop) participating in the formation of three dimensional structure were studied by alkylation modification was observed for the following phosphates: 8, 9, 11 (at the bend site between the acceptor and D-stem), 21- in the D-loop, 47 G, 47 I and 49 in the variable stem and at the joint of variable and T-stem. 56, 58, 59 in the T-loop. The variable arm of tRNA_{IAG}^{ser} from bovine liver is exposed in solution.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.— М.: Наука, 1984.—408 с.
2. Тукало М. А. Первичная и пространственная структура тРНК // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.— С. 1233—1248.
3. Vlassov V. V., Giege R., Ebel J.-P. Tertiary structure of tRNAs in solution monitored by phosphodiester modification with ethylnitrosourea // Eur. J. Biochem.—1981.—119, N 1.— P. 51—59.
4. Vlassov V. V., Giege R., Ebel J.-P. The tertiary structure of yeast tRNA^{Phe} in solution studied by phosphodiester bond modification with ethylnitrosourea // FEBS Lett.—1980.—120, N 1.— P. 12—16.
5. Калачнюк Л. Г., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Первичная структура тРНК_{IAG}^{ser} печени быка // Укр. биохим. журн.—1989.—61, № 1.— С. 72—75.
6. Выделение и характеристика препарата индивидуальной изоакцепторной тРНК_{IAG}^{ser} из печени быка / Л. Г. Калачнюк, Л. А. Козак, М. А. Тукало, Г. Х. Мацука // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 5.— С. 274—276.
7. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х. Определение остатков фосфорной кислоты, участвующих в образовании пространственной структуры тРНК_{IAG}^{Leu} молочной железы коров // Биоорг. химия.—1986.—12, № 11.— С. 1492—1497.
8. Donis-Keller H., Maxam A. M., Gilbert W. Mapping adenines, guanines in RNA // Nucl. Acids Res.—1977.—4, N 8.— P. 2527—2538.
9. Dock-Bregeon A. C., Westhof E., Moras D. Solution structure of a tRNA with a large variable region: yeast tRNA_{IAG}^{ser} // J. Mol. Biol.—1989.—206, N 4.— P. 707—722.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН Украины, Киев

Получено 01.04.92