

Молекулярное клонирование, секвенирование и экспрессия в клетках *Escherichia coli* лейцил-тРНК синтетазы *Thermus thermophilus*

А. Д. Яремчук^{1,2}, О. П. Коваленко¹, О. И. Гудзера¹, М. А. Тукало^{1,2}

¹Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

²ЕМБЛ
Ул. Жюли Горовиц, 6, Гренобль, Франция
mtukalo@imbg.org.ua

Цель. Клонирование и секвенирование лейцил-тРНК синтетазы *T. thermophilus* (ЛейРСТТ) с последующим созданием генно-инженерной конструкции для экспрессии белка в клетках *E. coli* и его выделение. **Методы.** Поиск гена ЛейРСТТ проводили методом Саузерн-блот-гибридизации с хромосомной ДНК, где в качестве зондов использованы меченные диоксигенином ПЦР-фрагменты ДНК. **Результаты.** Ген ЛейРС из клеток *T. thermophilus* HB27 клонирован и секвенирован. Открытая рамка считывания кодирует полипептид длиной 878 аминокислотных остатков (молекулярная масса 101 кДа). Сравнение аминокислотной последовательности ЛейРСТТ с таковыми гомологичных ферментов из других организмов показало, что она входит в группу аналогичных ферментов прокариотов, образуемую белками протобактерий, риккетсий, а также митохондрий эукариотов. Полученное филогенетическое древо ЛейРС демонстрирует дихотомическое разветвление на две линии: прокариото/митохондриально-эукариотические и архейно/цитоплазма-эукариотические белки. Отличия между прокариотической и архейной ветвями филогенетического древа ЛейРС в первую очередь связаны со структурой двух доменов фермента – корректирующего и С-концевого. Для экспрессии гена ЛейРСТТ в клетках *E. coli* соответствующий ген клонирован в экспрессирующий вектор рЕТ29b. **Выводы.** Клонированный ген *leuS* *T. thermophilus* и экспрессирующийся рекомбинантный белок будут использованы для структурно-функциональных исследований ЛейРСТТ, включая рентгеноструктурный анализ фермента и его мутантных форм в комплексе с различными субстратами.

Ключевые слова: аминоксил-тРНК синтетазы, лейцил-тРНК синтетаза *Thermus thermophilus*, филогенетическое древо.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы (АРСазы) играют ключевую роль в процессе декодирования генетической информации, катализируя присоединение гомологичной аминокислоты к специфической тРНК.

На основании строения их каталитических доменов АРСазы разделяют на два структурных класса [1, 2]. Входящие в подкласс 1а первого структур-

ного класса лейцил-, валил- и изолейцил-тРНК синтетазы (ЛейРС, ВалРС и ИлеРС соответственно) особенно тесно связаны и, вероятно, эволюционировали от общего предшественника. Эти три фермента являются крупными мономерами (около 100 кДа) со сложной мультидоменной структурой. Большой корректирующий домен (или СР1), являющийся уникальным для ЛейРС, ВалРС и ИлеРС, выполняет гидролитическую функцию в отношении ошибочно синтезированных продуктов.

Кристаллографическими исследованиями структуры ЛейРСТТ [3] выявлено, что ее корректирующий домен находится в другом положении в первичной структуре по сравнению с ИлеРС [4]. Оказалось, что у бактериальных и митохондриальных ЛейРС этот домен расположен после домена Zn-1, тогда как у археобактериальных и эукариотических ЛейРС, а также у всех ИлеРС и ВалРС корректирующий домен находится между двумя частями Zn-1-домена. Предстоит выяснить, связано это с особенностями узнавания тРНК прокариотическими ЛейРС или с корректирующей активностью упомянутых ферментов.

ЛейРС прокариотов является одной из APCаз, узнающих тРНК с длинной вариабельной петлей. Однако в отличие от двух других – серил- и тирозил-тРНК синтетаз [5, 6] – она не взаимодействует с длинной вариабельной петлей тРНК^{лей} [7] и не использует ее в качестве узнающего элемента [8]. Очевидно, что из-за сложности лейциновой системы для полного понимания молекулярных механизмов функционирования ЛейРСТТ в процессах аминокислотирования и редактирования необходимо изучить целый ряд комплексов фермента с различными субстратами с учетом данных по мутагенезу и биохимических результатов. В связи с этим клонирование гена *leuS* *T. thermophilus* стало необходимой частью структурно-функциональных исследований ЛейРСТТ.

В этой работе представлены данные по клонированию, секвенированию и анализу последовательности лейцил-тРНК синтетазы *T. thermophilus*, а также по ее экспрессии в клетках *E. coli*.

Материалы и методы. В работе использовали трис, НЕРЕС («ICN Biomedicals», США); ДЭАЭ-сефарозу, гепарин-сефарозу («Pharmacia», Швеция); MgCl₂, ЭДТА, тРНК *E. coli*, ферменты рестрикции, T4-ДНК-лигазу, лизоцим, набор для мечения и детекции ДНК дигоксигенином («Boehringer», ФРГ); ¹⁴C-лейцин, 238 мКи/ммоль (Институт исследования производства и использования изотопов, Чехия); ³⁵S-dATP, 50 Ки/ммоль («Amersham», Англия); набор для секвенирования ДНК («US Biochemical Corp.», США); вектор для прямого клонирования продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) – *pCRII* («Invitrogen», США). Pfu и Taq ДНК-

полимеразы («Stratagen», США). Все остальные реагенты имели квалификацию «осч» и «хч».

ЛейРС выделяли из клеток *T. thermophilus* HB27, как описано нами в [9].

Геномную ДНК из клеток *T. thermophilus* получали по [10].

ПЦР проводили по следующей программе: денатурация – 1 мин, 94 °С; отжиг – 1 мин, 50 °С; полимеризация – 1 мин, 72 °С (всего 30 циклов) в 100 мкл реакционного буфера, содержащего 50 мМ трисHCl, pH 9,0, 1,5 мМ MgCl₂, 20 мМ сульфат аммония, 1 мкл геномной ДНК, 0,2 мМ dNTP, по 40 пмоль олигонуклеотидных праймеров и 2,5 единицы Taq ДНК-полимеразы.

Обе цепи ДНК *leuS* гена секвенировали методом Сенгера (метод терминации цепи). Филогенетическое древо ЛейРСаз построено с использованием программы MegAlign (версия 5.1), входящей в пакет программ DNASTAR.

Результаты и обсуждение. Клонирование и секвенирование гена *leuS* *T. thermophilus*. Клонирование гена ЛейРС *leuS* выполняли в два этапа. Схема клонирования представлена на рис. 1. Вначале выделяли лейцил-тРНК синтетазу из клеток *T. thermophilus* HB27 с высокой степенью чистоты. Затем анализировали N-концевую аминокислотную последовательность первых 45 аминокислотных остатков (а. о.) (MEKYNPNAIEAKWQRFEEKGFMK AKDLPGGRGKQYVLMFPYPS). На основе информации о N-концевой последовательности ЛейРСТТ синтезировали два олигонуклеотидных праймера (5'-GGGATTCATGGAGAAGTACAACCC-3' и 5'-GGGAATCTTSGCCTTCATGAASCC-3'), отвечающих аминокислотным остаткам 1–6 и 21–26 соответственно с учетом преимущественного использования кодонов *T. thermophilus*, в которых третьим нуклеотидом является G или C. С помощью этих праймеров в ПЦР амплифицирован ДНК-фрагмент длиной 78 пар нуклеотидов (п. н.).

Дальнейшее клонирование в плазмиду *pUC19* и секвенирование этого фрагмента подтвердили, что он соответствует 5'-концу структурного гена ЛейРСТТ. Меченный дигоксигенином ПЦР-фрагмент использован в качестве зонда (зонд 1) для поиска соответствующего гена методом Саузерн-блот-гибридизации с хромосомной ДНК, расщепляемой раз-

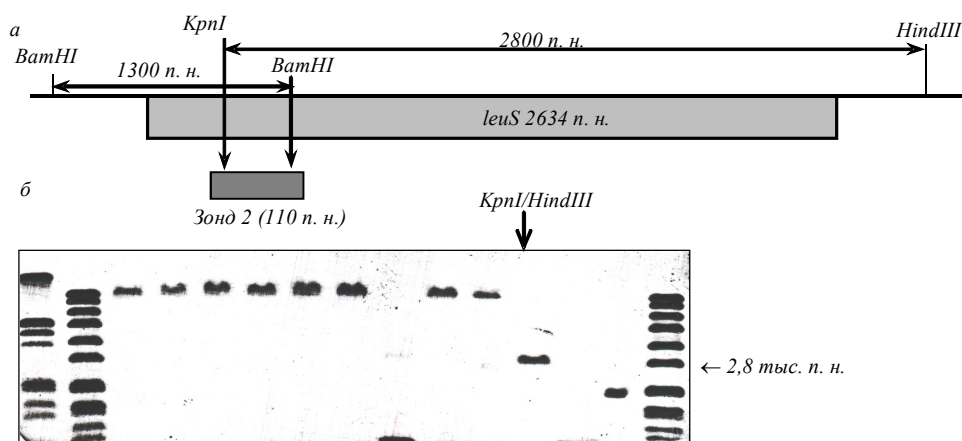


Рис. 1. Схема клонирования гена лейцил-тРНК синтетазы *T. thermophilus*: а – фрагменты хромосомной ДНК *BamHI* и *KpnI/HindIII*, перекрывающие всю последовательность гена ЛейРСТТ и второй зонд, использованный для поиска недостающей части гена *leuS*; б – Саузерн-блот анализ рестриктных фрагментов хромосомной ДНК. Указан положительный сигнал, полученный от фрагмента хромосомной ДНК *T. thermophilus KpnI/HindIII* длиной 2,8 тыс. п. н.

личными рестриктазами и фракционированной в агарозном геле. В итоге с помощью рестриктазы *BamHI* обнаружен фрагмент ДНК длиной 1300 п. н., эффективно гибридизующийся с пробой. Затем этот фрагмент элюировали из геля и клонировали в плазмиду *pUC19*. После трансформации компетентных клеток *E. coli* проводили поиск колоний, несущих плазмиду с данным фрагментом, методом гибридизации колоний с зондом 1. В результате секвенирования указанного фрагмента ДНК выяснилось, что в его состав входит 5'-концевая последовательность искомого гена длиной 720 п. н., что составляет около 25 % полной длины структурного гена ЛейРСТТ.

Второй этап клонирования гена ЛейРСТТ связан с поиском фрагментов, содержащих недостающую информацию о его последовательности. Для этого на основе последовательности найденной ранее части гена синтезированы олигонуклеотидные праймеры и с помощью ПЦР получен фрагмент длиной 110 п. н., использованный в качестве нового зонда (зонд 2) для Саузерн-гибридизации (рис. 1, б). При гибридизации положительный сигнал дал фрагмент хромосомной ДНК *T. thermophilus KpnI/HindIII* длиной 2,8 тыс. п. н. Клонирование этого фрагмента в плазмиду *pUC19* и его последующее секвенирование показали, что он содержит остальную часть гена *leuS* длиной 1334 п. н. Открытая рамка считывания полного гена *leuS T. thermophilus* включает 2634 п. н.

Анализ аминокислотной последовательности ЛейРСТТ. Ген *leuS* кодирует полипептидную цепь длиной 878 а. о. (рис. 2). Расчетная молекулярная

масса ЛейРСТТ составляет 101 кДа, что совпадает со значением молекулярной массы, установленным электрофорезом в SDS-ПААГ для ЛейРСТТ [11]. Сравнение аминокислотной последовательности ЛейРС *T. thermophilus* с таковыми гомологичных ферментов из других организмов показало, что она входит в группу аналогичных ферментов прокариотов, образуемую белками протобактерий (*Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae* и др.), риккетсий (*Rickettsia prowazekii*), а также митохондрий эукариотов (рис. 3).

Вторая группа прокариотических ЛейРС образована в основном ферментами из грамм-положительных бактерий (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyrogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* и др.), микоплазм (*Mycoplasma genitalium*, *M. pneumoniae*), спирохет (*Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*) и хламидий (*Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*). Первичная структура ЛейРСТТ имеет значительную гомологию с соответствующими ферментами из других бактериальных источников. Например, идентичность ЛейРСТТ с представителем той же бактериальной субгруппы, ЛейРС *E. coli*, составляет 43 %, а с представителем второй субгруппы, ЛейРС *M. tuberculosis*, – 37 %. В то же время гомология ЛейРСТТ с ферментами архебактерий или цитоплазмы эукариотов значительно ниже и идентичность с ними колеблется от 27 до 32 % в зависимости от источника белка. Полученное филогенетическое древо ЛейРСаз демонстрирует дихотомическое разветвление на две линии: прокариото/митохондриально-эукариотические и архейно/цитоплазмозукариотические ферменты (рис. 3).

MEKYNPHATEAKWQRFWEKGFMKAKDLPGGRGKQYVLMFPYPGSDLHMGHHLKKNYTMGDVLAARFRMQGYEVLHPMGWD 80
 AFGLPAENAALKFVHPKDWTYANIRQAKESLRMLGILYDWDREVTTCPEEYRWNQWIFLKMWEKGLAYRAKGLVNW 160
 PKCQTVLANEQVVEGRWCWRHEDTPVEKRELEQWYLRI TAYAERLLKDLLEGLNWEKVKAMQRAWIGRSEGAELFFVEGK 240
 EVRI PVFTTRPDTLFGATFLVLAPEHPLTLELAAPEKREEVLAIVEAAKRKTEIERQAEGRKTVFLGAYALNPATGER 320
 IPIWTADYVLFYGTGAIMAVPAHQDQRYEFARKFGLPIKKVIERPGEPLPEPLERAYEPEGMVNSGPFDDGTESEEGKR 400
 KVI AWLEEKGLGKGRVTYRLRDWLHKPQRYWGTPIPMVHCEACGVVPEEELPVLLPDLKDVEDI RPKGKSPLEAHPEF 480
 YETTCPSHGGPPADTDTMDTFFDSSWYYLRYTDPHNDRLPFDPEKANAWMPVDQYIGGVEHAVLHLLYSRFFTKFLHDLG 560
 MVKVEEPFQGLFTQGMVLAWTDFGVEVEGVSVRLPEPTRIRLEIPESALSLEDVRKMGAE LRPHEGDTLHLWKPAVMSK 640
 SKNGVMVGFVFKQGDARIITILFAAPPENEMVWTEEGVQAWRFLNRIYRRVAEDREALLETSGVVFQAEALEGKDRE 720
 LYGLKHETLKKVTEDEALRFNTAIAALMEFLNALYERKDRPVTPVYRTAIRYYLQMLFPFAPHLAEEELWHWFWDPSLF 800
 EAGWPELDEKALEKDVVEVAVQVNGRVRGTIHI PKDAPLEVARAEALKVRNVRAHLEKGEVKEIYVPGKILNLVVRG 878

Рис. 2. Выведенная из нуклеотидной последовательности гена *leuS* аминокислотная последовательность ЛейРСТТ. Подчеркнута N-концевая последовательность белка, определенная пептидным секвенированием

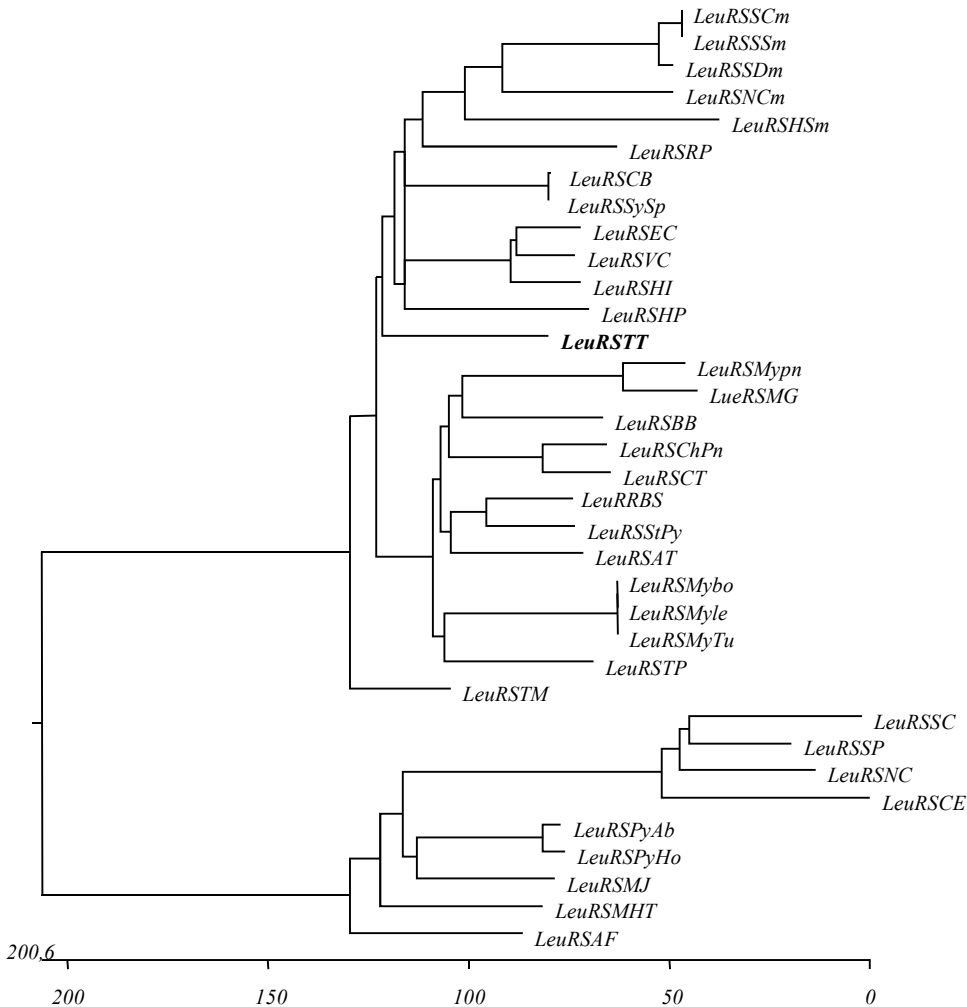


Рис. 3. Филогенетическое древо последовательностей лейцил-тРНК синтетаз. Из корня древа происходит разветвление между бактериальными ЛейРС, включающими митохондриальные ферменты, и архейными ЛейРС, содержащими ферменты из цитоплазмы эукариотов. Обозначения: *LeuRSFA* – фермент из *Archaeoglobus fulgidus*; *BB* – *Borrelia burgdorferi*; *BS* – *Bacillus subtilis*; *CT* – *Chlamydia trachomatis*; *EC* – *Escherichia coli*; *HI* – *Haemophilus influenzae*; *HP* – *Helicobacter pylori*; *HSm* – *Homo sapiens*, митохондриальная; *MTH* – *Methanobacterium thermoautotrophicum*; *MJ* – *Methanococcus jannaschii*; *MG* – *Mycoplasma genitalium*; *Mypp* – *Mycoplasma pneumoniae*; *MyTu* – *Mycobacterium tuberculosis*; *NC* – *Neurospora crassa*, цитоплазматическая; *NCm* – *Neurospora crassa*, митохондриальная; *PyAb* – *Pirococcus albia*; *PyHo* – *Pirococcus horikoshii*; *RP* – *Rickettsia prowazekii*; *SC* – *Saccharomyces cerevisiae*, цитоплазматическая; *SCm* – *Saccharomyces cerevisiae*, митохондриальная; *StPy* – *Streptococcus pyogenes*; *SySp* – *Synechocystis species*; *TM* – *Thermotoga maritime*; *TP* – *Treponema pallidum*; *TT* – *Thermus thermophilus*; *VC* – *Vibrio cholerae*

Таким образом, очевидно, что эукариотические митохондриальные и цитоплазматические формы ЛейРС произошли соответственно от бактериальных и архейных предшественников. Различия между прокариотической и архейной ветвями филогенетического древа ЛейРСаз, в первую очередь, связаны со структурой двух доменов фермента – корректирующего и С-концевого, присоединившихся к каталитическому домену белка на после-

дующих этапах эволюции. Анализ первичных структур С-домена ЛейРС из прокариото/митохондриально-эукариотической и архейно/цитоплазматической ветвей выявил их значительные отличия. Это указывает на возможную различную роль С-концевого домена в функционировании ЛейРС разного происхождения.

Из экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что С-концевой домен лейцил-тРНК

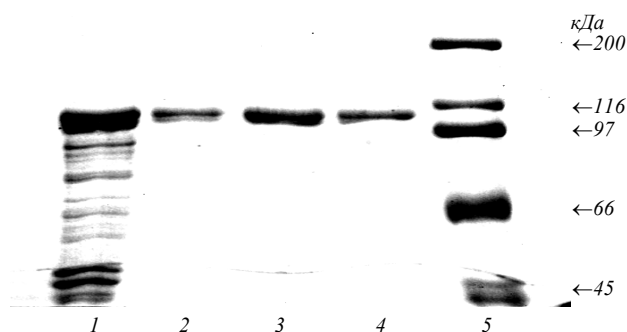


Рис. 4. Результаты электрофореза в 10 %-м SDS-ПААГ алиquot, полученных при экспрессии и очистке ЛейРС *T. thermophilus*: 1 – фракция растворимых белков после разрушения клеток; 2 – фракция растворимых белков после прогревания при температуре 72 °С; 3, 4 – фракции, полученные в результате последовательных хроматографий на ДЭАЭ- и гепарин-сефарозе соответственно; 5 – маркер молекулярной массы белков

синтез *T. thermophilus* и *E. coli* (вероятно, и других ЛейРС прокариотов) эволюционно приобретен для усиления скорости катализа в реакциях аминокислотирования и редактирования [12, 13]. В то же время делеция С-концевого домена архейной ЛейРС *P. horikoshi* приводит к потере аминокислотизирующей активности, но практически не влияет на ее редактирующую способность [14]. При этом изучение кристаллографических структур комплексов ЛейРС с тРНК показало, что С-концевой домен прокариотической ЛейРСТТ взаимодействует с углом L-формы тРНК^{Leu} [7], тогда как С-концевой домен архейной ЛейРС *P. horikoshi* связывается с переменным стеблем гомологичной тРНК [15]. Вследствие расшифровки пространственных структур прокариотической ЛейРС *T. thermophilus* [3] и архейной ЛейРС *P. horikoshi* [15] однозначно установлено существование двух различных включений в полипептидную цепь белка и, соответственно, двух разных ориентаций корректирующего домена. Следует отметить, что эукариотические митохондриальные ЛейРС имеют ориентацию корректирующего домена, как у бактериальной ЛейРСТТ, а эукариотические цитоплазматические ЛейРС – ориентацию, типичную для ЛейРС архебактерий. Этот факт полностью подтверждает разделение ЛейРС на две соответствующие ветви в построенном филогенетическом древе.

Экспрессия ЛейРС *T. thermophilus* в клетках *E. coli*. Для получения больших количеств ЛейРСТТ, необходимых для структурно-функциональных ис-

следований, ген *leuS* амплифицировали с использованием ПЦР и клонировали в вектор *pCRII*. После проверки наличия нуклеотидной последовательности гена ЛейРСТТ в соответствующей конструкции его переклонировали в экспрессирующий вектор *pET29b*, содержащий промотор Т7 РНК-полимеразы. Рекомбинантный вектор использовали для трансформации клеток *E. coli* штамм BL21(DE3) рLysS. Белок очищали термической денатурацией внутриклеточных белков *E. coli* при температуре 72 °С и двумя последующими колоночными хроматографиями на ДЭАЭ-сефарозе и гепарин-сефарозе. Конечный выход препарата ЛейРС ТТ составляет около 20 мг белка из 1 л культуры клеток и имеет чистоту более 95 % по данным электрофореза в ПААГ (рис. 4).

Выводы. Рекомбинантный белок успешно использован для кристаллизации ЛейРСТТ в комплексе с различными субстратами [3, 16], включая тРНК^{Leu} [7], а также для изучения молекулярных механизмов действия новых антибиотиков [17].

Полученная генно-инженерная конструкция для экспрессии ЛейРСТТ в клетках *E. coli* очень важна для углубления структурно-функциональных исследований функционирования ЛейРС в процессах аминокислотирования и редактирования, связанных с проведением интенсивного мутагенеза ЛейРСТТ, получением новых структурных и биохимических результатов при анализе мутантных форм фермента.

A. D. Yaremchuk^{1,2}, O. P. Kovalenko¹, O. I. Gudžera¹, M. A. Tukalo^{1,2}

Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* cells *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase

¹State key laboratory of molecular and cellular biology, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

²EMBL
6, rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex 9, France

Summary

Aim. Cloning and sequencing of the *T. thermophilus* leucyl-tRNA synthetase (*LeuRSTT*) followed by the creation of genetically engineered construct for protein expression in *E. coli* cells and its purification. **Methods.** Searching for the *LeuRSTT* gene was performed by Southern blot hybridization with chromosomal DNA, where digoxigenin-labeled PCR fragments of DNA were used as probes. **Results.** The gene of *T. thermophilus* HB27 leucyl-tRNA synthetase was cloned and sequenced. The open reading frame encodes a polypeptide chain of 878 amino

acid residues in length (molecular mass 101 kDa). Comparison of the amino acid sequence of *T. thermophilus* LeuRS with that of the enzymes from other organisms showed that LeuRSTT was a part of the group of similar enzymes of prokaryotes, formed by the proteins of protobacteria, rickettsia and mitochondria of eukaryotes. The resulting phylogenetic tree of LeuRSs reveals dichotomous branching into two lines: prokaryotic/eukaryotic mitochondrial and archaeal/eukaryotic cytosolic proteins. Differences between prokaryotic and archaeal branches of the LeuRSs phylogenetic tree are primarily due to the structure of two domains of the enzyme – the editing and the C-terminal. *T. thermophilus* LeuRS was expressed in *E. coli* cells by cloning the corresponding gene into pET29b vector. **Conclusions.** The cloned *T. thermophilus* leuS gene and expressed recombinant protein will be used for structural and functional studies on LeuRSTT, including X-ray analysis of the enzyme and its mutant forms in complex with different substrates.

Keywords: aminoacyl-tRNA synthetases, leucyl-tRNA synthetase *Thermus thermophilus*, phylogenetic tree.

Г. Д. Яремчук, О. П. Коваленко, О. І. Гудзера, М. А. Тукало

Молекулярне клонування, секвенування і експресія в клітинах *Escherichia coli* лейцил-ТРНК синтетази *Thermus thermophilus*

Резюме

Мета. Клонування і секвенування лейцил-тРНК синтетази *T. thermophilus* (ЛейРСТТ) з наступним створенням генно-інженерної конструкції для експресії білка в клітинах *E. coli* та його виділення. **Методи.** Пошук гена ЛейРСТТ проводили методом Саузерн-блот-гібридизації з хромосомною ДНК, зондами слугували мічені дигоксигеніном ПЦР-фрагменти ДНК. **Результати.** Ген ЛейРС з клітин *T. thermophilus* HB27 клонувано і секвенувано. Відкрита рамка зчитування кодує поліпептид довжиною 878 амінокислотних залишків (молекулярна маса 101 кДа). Порівняння амінокислотної послідовності ЛейРСТТ з послідовностями гомологічних ферментів з інших організмів показало, що вона входить до групи аналогічних ферментів прокариотів, сформованої білками протобактерій, риккетсій, а також мітохондрій еукаріотів. Одержане філогенетичне дерево ЛейРС демонструє дихотомічне розгалуження на дві лінії: прокариото/мітохондріально-еукаріотичні і архейно/цитоплазмно-еукаріотичні білки. Розбіжності між прокариотичною і архейною гілками філогенетичного дерева ЛейРС у першу чергу пов'язані зі структурою двох доменів ферменту – коректуючого і С-кінцевого. Для експресії гена ЛейРСТТ у клітинах *E. coli* відповідний ген клонувано в експресуючий вектор pET29b. **Висновки.** Клонований ген *leuS* *T. thermophilus* і рекомбінантний білок, який експресується, будуть використані для структурно-функціональних досліджень ЛейРСТТ, включаючи рентгеноструктурний аналіз ферменту і його мутантних форм у комплексі з різними субстратами.

Ключові слова: аміноацил-тРНК синтетази, лейцил-тРНК синтетаза *Thermus thermophilus*, філогенетичне дерево.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs // *Nature*.–1990.–**347**, N 6289.–P. 203–206.
- Cusack S., Berthet-Colominas C., Hartlein M., Nassar N., Leberman R. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å // *Nature*.–1990.–**347**, N 6290.–P. 249–255.
- Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. The 2 Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue // *EMBO J*.–2000.–**19**, N 10.–P. 2351–2361.
- Nureki O., Vassilyev D. G., Tateno M., Shimada A., Nakama T., Fukai S., Konno M., Hendrickson T. L., Schimmel P., Yokoyama S. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate // *Science*.–1998.–**280**, N 5363.–P. 578–582.
- 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.
- Tukalo M., Yaremchuk A., Fukunaga R., Yokoyama S., Cusack S. The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} in the post-transfer-editing conformation // *Nat. Struct. Mol. Biol.*–2005.–**12**, N 10.–P. 923–930.
- 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.
- Yaremchuk A., Cusack S., Gudzera O., Grotli M., Tukalo M. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase and its complexes with leucine and a non-hydrolysable leucyl-adenylate analogue // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*–2000.–**56**, Pt 5.–P. 667–669.
- Marmur J. A. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // *J. Mol. Biol.*–1961.–**3**, N 2.–P. 208–218.
- Yaremchuk A. D., Gudzera O. I., Egorova S. P., Rozhko D. I., Kriklyvi I. A., Tukalo M. A. Leucyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. Purification and some properties of the crystallizing enzyme // *Biopolym. Cell*.–2001.–**17**, N 3.–P. 216–220.
- Gudzera O. I., Yaremchuk A. D., Tukalo M. A. Functional role of C-terminal domain of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase // *Biopolym. Cell*.–2010.–**26**, N 6.–P. 478–485.
- Hsu J. L., Rho S. B., Vannella K. M., Martinis S. A. Functional divergence of a unique C-terminal domain of leucyl-tRNA synthetase to accommodate its splicing and aminoacylation roles // *J. Biol. Chem.*–2006.–**281**, N 32.–P. 23075–23082.
- Fukunaga R., Yokoyama S. The C-terminal domain of the archaeal leucyl-tRNA synthetase prevents misediting of isoleucyl-tRNA(Ile) // *Biochemistry*.–2007.–**46**, N 17.–P. 4985–4996.
- Fukunaga R., Yokoyama S. Crystal structure of leucyl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel editing domain orientation // *J. Mol. Biol.*–2005.–**346**, N 1.–P. 57–71.
- Lincecum T. L. Jr., Tukalo M., Yaremchuk A., Mursinna R. S., Williams A. M., Sproat B. S., Van Den Eynde W., Link A., Van Calenbergh S., Grotli M., Martinis S. A., Cusack S. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase // *Mol. Cell*.–2003.–**11**, N 4.–P. 951–963.
- Rock F. L., Mao W., Yaremchuk A., Tukalo M., Crepin T., Zhou H., Zhang Y. K., Hernandez V., Akama T., Baker S. J., Plattner J. J., Shapiro L., Martinis S. A., Benkovic S. J., Cusack S., Alley M. R. An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site // *Science*.–2007.–**316**, N 5832.–P. 1759–1761.

UDC 577.217

Received 11.03.11