



УДК 577.113.4

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ
тРНК^{Leu}_{IAG} МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВ
МЕТОДАМИ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ***Петрушенко З. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х.**Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев*

С помощью химических реагентов было исследовано участие азотистых оснований тРНК^{Leu}_{IAG} из молочной железы коров в формировании ее пространственной структуры. Показано, что низкий уровень модификации специфическими реагентами имеют остатки гуанозина в положениях 10 (m²G), 13, 15, 23, 24, 29, 30, 47H, 51, 52, 53, 57; цитидина в положениях 48 (m⁵C), 56 и все, которые находятся в двухспиральных участках; аденозина в положениях 14, 22, 31, 42, 59, 64.

Большая часть основания тРНК^{Leu}_{IAG}, участвующих в формировании ее пространственной структуры, соответствует по положениям нуклеотидам тРНК^{Phe} из дрожжей, что свидетельствует о возможной общей роли данных оснований в формировании пространственной структуры этих двух молекул.

В настоящее время методами рентгеноструктурного анализа в деталях изучена пространственная структура тРНК^{Phe} из дрожжей в кристалле [1, 2]. Имеются также данные о макромолекулярном строении тРНК^{Met} дрожжей и *E. coli* и тРНК^{Asp} дрожжей [3–5]. Однако метод рентгеноструктурного анализа позволяет получить данные только о фиксированной конформации макромолекулы. В то же время многие принципиально важные аспекты функционирования тРНК в клетке связаны с ее конформационными превращениями. Поэтому большой интерес представляют исследования пространственной структуры тРНК в физиологических условиях, т. е. в растворе. Такие работы уже проводятся, хотя в подавляющем большинстве они связаны с изучением тРНК, имеющих короткую переменную петлю. Что касается наших знаний о пространственной структуре класса тРНК с длинной переменной петлей, то они крайне ограничены. Неизвестной остается и роль переменной петли в структурной организации и функционировании тРНК данного класса.

Для изучения пространственной структуры нуклеиновых кислот в растворе наиболее подходящими являются методы ЯМР и химической модификации. В 1980 г. Д. Питти и В. Гилберт разработали химические подходы, позволяющие изучать доступность азотистых оснований в молекулах тРНК для специфических химических реагентов [6]. Этот метод сейчас используется для изучения конформации различных видов РНК [7–9]. Механизм предложенных реакций хорошо изучен [10].

В данной работе мы использовали методы химической модификации для исследования пространственной структуры лейциновой тРНК_{IAG} из молочной железы коров, которая относится к классу тРНК с длинной переменной петлей. Представленные данные с учетом информации о доступности фосфатов тРНК^{Leu}_{IAG}, полученной нами ранее [11], позволяют получить достаточно полную картину пространственной структуры этой молекулы.

Реакционную способность остатков гуанозина и цитидина исследовали с помощью диметилсульфата, алкилирующего N7-положение гуанина и N3-положение цитозина. Остатки аденозина исследовали с помощью карботоксимилирующего реагента — диэтилпирокарбоната. тРНК предварительно метили с помощью ³²P по одному из концов. Реакции проводили в трех экспериментальных условиях: а) в условиях, сохраняющих нативную структуру молекулы тРНК (0,01 M MgCl₂, 0,1 M NaCl, 37° C); б) в полу-

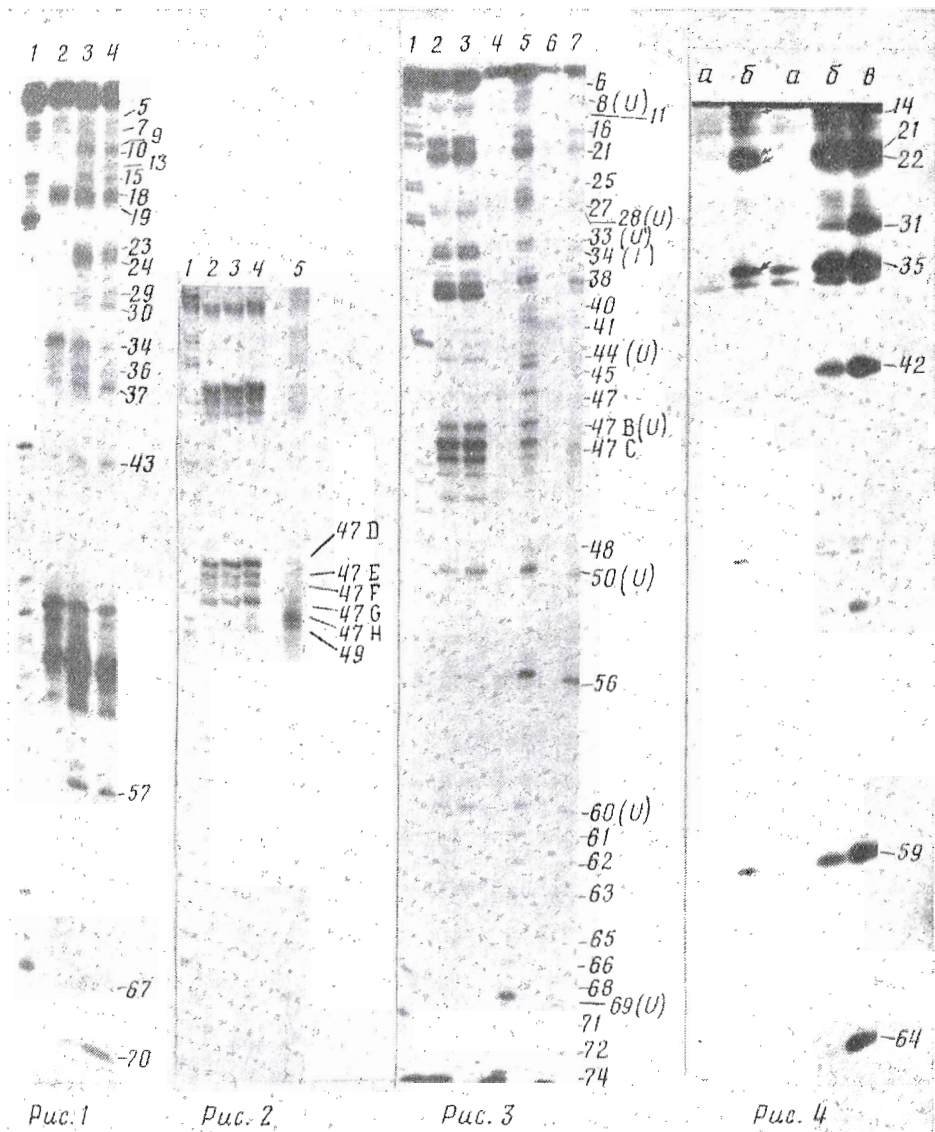


Рис. 1. Радиоавтограф 11% ПААГ, в котором были разделены (4000 В, 3,5 ч) фрагменты 3'-меченой тРНК^{Leu}_{LAG}, полученные в результате алкилирования остатков гуанозина DMSO в нативных (2), полуденатурирующих (3) и денатурирующих (4) условиях. 1 — тРНК, частично гидролизованная рибонуклеазой T₁

Рис. 2. Радиоавтограф 12,5% ПААГ, в котором были разделены фрагменты 3'-меченой тРНК^{Leu}_{LAG}, полученные в результате алкилирования остатков гуанозина DMSO в нативных (2-4) и денатурирующих (5) условиях. 1 — тРНК, частично гидролизованная рибонуклеазой T₁

Рис. 3. Результаты модификации остатков цитидина тРНК^{Leu}_{LAG} DMSO в нативных (2,3) и денатурирующих (5) условиях. 1 — тРНК^{Leu}_{LAG}, гидролизованная рибонуклеазой T₁; 6 — контрольная инкубация в отсутствие реагентов; 7 — тРНК, модифицированная по остаткам уридина. Условия электрофореза см. рис. 1

Рис. 4. Результаты модификации остатков аденозина тРНК^{Leu}_{LAG} диэтилпинокрбонатом в условиях, стабилизирующих пространственную структуру молекулы (а), в полуденатурирующих (б) и денатурирующих (в) условиях. Условия электрофореза см. рис. 1

денатурирующих условиях, в которых разрушалась третичная структура тРНК, но сохранялась вторичная ($1 \cdot 10^{-3}$ М EDTA, 37° С); в) в денатурирующих условиях ($1 \cdot 10^{-3}$ М EDTA, 90° С).

Результаты химической модификации тРНК диметилсульфатом
и диэтилпирокарбонатом *

Номер нуклеозида	Нуклеозид	Н	ПД	Д	Номер нуклеозида	Нуклеозид	Н	ПД	Д
5	G	+	+	+	45	C	-	-	+
6	C	-	-	+	47	C	-	+	+
7	G	+	+	+	47C	C	+	-	+
9	C	+	+	+	47D	G	+	+	+
10	m ² G	-	-	+	47E	G	+	+	+
11	C	-	-	+	47F	G	+	+	+
13	G	-	±	+	47G	G	+	+	+
14	A	-	+	+	47H	G	-	±	+
15	G	-	+	+	48	m ⁵ C	-	+	+
16	C	+	+	+	49	G	+	+	+
18	G	+	+	+	51	G	-	+	+
19	G	+	+	+	52	G	-	+	+
20A	C	-	+	+	53	G	-	+	+
21	A	±	+	+	56	C	-	+	+
22	A	-	+	+	57	G	-	+	+
23	G	-	+	+	59	A	-	+	+
24	C	-	+	+	61	C	-	-	+
25	C	-	-	+	62	C	-	-	+
26	m ² ₂ G	-	±	+	63	C	-	-	+
27	C	-	-	+	64	A	-	-	+
29	G	-	±	+	65	C	-	-	+
30	G	±	±	+	66	C	-	-	+
31	A	-	-	+	67	G	+	+	+
34	U	+	+	+	68	C	-	-	+
35	A	±	+	+	70	G	+	+	+
36	G	+	+	+	71	C	-	-	+
37	m ¹ G	+	+	+	72	C	-	-	+
38	C	+	+	+	73	A	+	+	+
40	C	-	-	+	74	C	+	+	+
41	C	-	-	+	75	C	+	+	+
42	A	-	-	+	76	A	+	+	+
43	G	±	+	+					

* Н, ПД, Д — модификация тРНК в нативных, полуденатурирующих и денатурирующих условиях соответственно. Плюс и минус обозначают наличие или отсутствие модификации, а ± — низкий уровень модификации.

Модификация азотистых оснований ослабляет фосфодиэфирные связи данного нуклеотида, что позволяет в определенных условиях легко расщеплять полинуклеотидную цепь в местах модификации. Полученные в результате расщепления тРНК меченые олигонуклеотиды анализировали высоковольтным электрофорезом в полиакриламидном геле. Результаты эксперимента по модификации остатков гуанозина тРНК показаны на рис. 1. Для лучшей демонстрации реакционной способности остатков гуанозина в районе варибельного стебля (в положениях 47D, 47F, 47G, 47E и 47H) представлен рис. 2. Из рис. 1 и 2 видно, что в денатурирующих условиях уровень модификации большинства остатков гуанозина сильно не отличается. В то же время в нативных условиях высокий уровень модификации наблюдается только для некоторых остатков гуанозина (положения 18, 19, 34I, 36, 47D, 47E, 47F, 47G), а ряд остатков гуанозина имеет очень низкий уровень модификации (положения 10 (m²G), 13, 15, 23, 24, 29, 30, 47H, 51, 52, 53, 57).

При использовании диметилсульфата для изучения реакционной способности остатков цитидина информацию можно получить лишь о тех из них, которые входят в петлевые участки тРНК. Это связано с тем, что алкилирование проходит по N3-атому цитозина, который вовлечен в образование уотсон-криковских водородных связей. Мы показали (рис. 3), что в тРНК ^{Leu}_{IAG} в нативных условиях низкий уровень модификации обнаружен для m⁵C в положении 48 и цитидина в положении 56 (помимо тех, которые входят в двуспиральные участки). Низкий уровень алкилирования этих двух оснований можно объяснить вовлечением их N3-атомов в образование

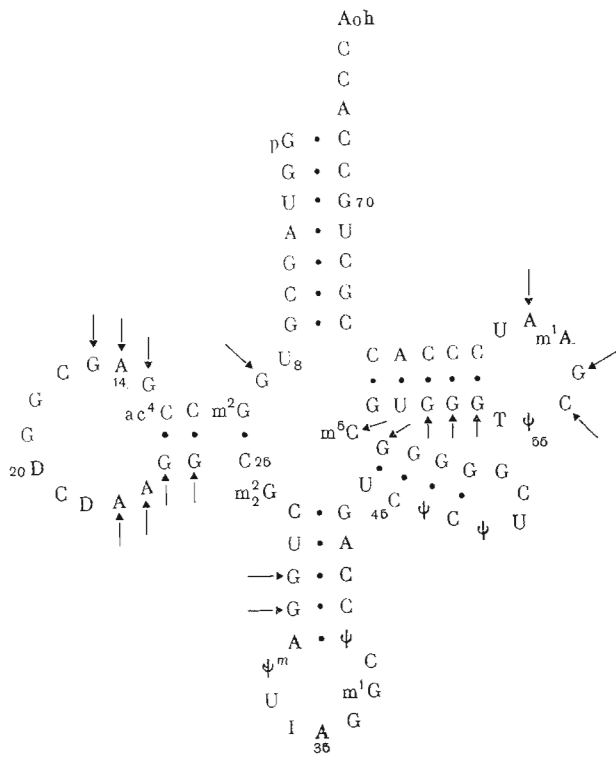


Рис. 5. Структура тРНК^{Leu}_{IAG} в виде клеверного листа. Стрелками обозначены основания, имеющие низкий уровень модификации специфическими химическими реагентами

вторичных взаимодействий, формирующих пространственную структуру тРНК.

При изучении модификации остатков аденозина учитывался тот факт, что стекинг-взаимодействие не позволяет проводить полную модификацию диэтилпирокарбонатом N7-положения основания, т. е. информация об остатках аденозина, входящих в спиральные участки, теряется. Результаты по модификации тРНК^{Leu}_{IAG} диэтилпирокарбонатом (рис. 4) свидетельствуют, что низкий уровень модификации в нативных условиях наблюдается для остатков аденозина в положениях 14, 22, 31, 42, 59 и 64.

Обобщенные результаты по модификации нуклеотидных остатков в тРНК^{Leu}_{IAG} сведены в таблице и показаны на рис. 5.

При сравнении полученных нами данных с литературными можно увидеть, что большинство нуклеотидных остатков тРНК^{Leu}_{IAG}, имеющих низкую реакционную способность в нативных условиях, аналогичны таковым для тРНК^{Pbc} из дрожжей [6]. Эти остатки, очевидно, вовлечены в формирование пространственной структуры тРНК путем участия во вторичных водородных взаимодействиях типа основание — основание (A¹⁴—U⁸, G¹⁵—m⁶C⁴⁸, C³⁶—G¹⁹) или основание — рибоза (N7 G⁵⁷ — 2 OH ψ⁵³). Некоторые из низкорекционных нуклеотидов, возможно, вовлечены во взаимодействие с ионами магния (A²¹, G⁵¹, G⁵², G⁵³, A⁵⁹) или молекулами воды (G¹⁵, G²³, G²⁴) [6, 12]. Особый интерес представляют азотистые основания переменного стебля. Высокий уровень модификации G^{47D}, G^{47E}, G^{47G} и G^{47F} свидетельствует об их экспонированности в раствор. В формировании определенной конформации переменного стебля тРНК^{Leu}_{IAG}, по всей видимости, участвуют фосфаты в положениях 45, 48, 49, 50 [11], а также остаток гуанозина в положении 47H.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных

можно сделать вывод, что в тРНК^{Leu}, имеющей длинную переменную петлю, осуществляется ряд вторичных взаимодействий, таких же, как и в тРНК^{Phe}, имеющей короткую переменную петлю. В совокупности с данными по модификации тРНК^{Leu}_{LAG} этилинирозомочевинной вышеприведенные результаты указывают на то, что укладка рибозофосфатного остова тРНК^{Leu} в большей части близка к таковой для тРНК^{Phe} из дрожжей. Отличия, как и предполагал Сундаралингама [13] при создании расчетной модели пространственной структуры тРНК^{Ser}₁ *E. coli*, заключаются в отсутствии некоторых вторичных взаимодействий (например, между G9 и A22). С другой стороны, для поддержания определенной конформации переменной ветви, по всей вероятности, существуют дополнительные взаимодействия. В модели Сундаралингама фосфаты 47К, 47I и 47М в углу переменной ветви тРНК^{Ser}₁ сближены пространственно с фосфатом-22 в D-петле и фосфатом-57 в Т-петле соответственно. По нашим данным, эти фосфаты в тРНК^{Leu}_{LAG} тоже имеют низкую реакционную способность. Вполне возможно, что указанные фосфаты молекулы тРНК^{Leu}_{LAG} соединяются между собой ионом магния и вместе с G^{47H} формируют определенное положение переменной ветви. Более точное расположение переменной ветви мы планируем определить с помощью метода так называемых «молекулярных линеек» на основе хлорамбуцила.

Экспериментальная часть

Препарат индивидуальной тРНК^{Leu}_{LAG} получали из суммарного препарата тРНК лактирующей молочной железы коров методами, описанными нами ранее [14].

Использовали диметилсульфат (ВДН, Великобритания), диэтилпирокاربонат (Calbiochem, США), гидразин, боргидрид натрия, акриламид, N,N-метиленбисакриламид (Serva, ФРГ), [γ -³²P]АТФ и [γ -³²P]АТФ (Amersham, Англия) с уд. акт. 3000–5000 Ки/ммоль; щелочную фосфатазу *E. 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*, индуцированной фагом T4 — препарат фирмы Boehringer (ФРГ); тРНК нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.2.1), любезно предоставленную А. С. Бутоным (ИХ СО АН СССР).

Мечение тРНК^{Leu}_{LAG} по 3'- и 5'-концу проводили как описано в работах [15] и [16] соответственно.

Частичный гидролиз тРНК Т₁-РНКазой проводили как в работе [17].

Алкилирование остатков гуанозина диметилсульфатом проводили в трех экспериментальных условиях: нативных, полуденатурирующих и денатурирующих. Для сохранения нативной конформации тРНК алкилировали в 100 мкл 0,05 М каодилята натрия, pH 7,0, содержащего 0,1 М NaCl и 0,01 М MgCl₂. Для алкилирования 0,1 мкг тРНК^{Leu}_{LAG}, меченой по одному из концов, 15 мин инкубировали при 37° С без добавления реагента, а затем после добавления 0,25 мкл диметилсульфата инкубировали еще 12 мин. Для создания полуденатурирующих условий инкубацию проводили в 0,05 М каодилята натрия, pH 7,0, содержащем 1 мМ EDTA, и том же температурном режиме. В денатурирующих условиях тРНК инкубировали 1 мин при 90° С в 300 мкл 0,05 М каодилята натрия, pH 7,0, содержащего 1 мМ EDTA и 0,5 мкл диметилсульфата. Реакцию останавливали добавлением 25 мкл (в первом и втором случаях) и 70 мкл (в третьем случае) 1,0 М трис-ацетатного буфера, pH 7,5, содержащего 1,0 М 2-меркаптоэтанол, 1,5 М ацетат натрия, и 2,5 объема дважды перегнанного этанола. Для лучшего осаждения тРНК в реакционные смеси вносили по 20 мкг 5S РНК. После центрифугирования осадок РНК растворяли в 10 мкл 1 М трис-НСI-буфера, pH 8,2, добавляли 10 мкл 1,4 М боргидрата натрия (NaBH₄, растворяли в 0,1 мМ NaOH) и инкубировали 30 мин в темноте при 0° С. Реакцию останавливали осаждением этанолом.

Разрыв полинуклеотидной цепи по модифицированным основаниям проводили в 1,0 М анилине, pH 4,5, как описано в работе [6]. Полученные образцы гидролизованной тРНК анализировали высоковольтным электрофорезом в ПААГ в 0,05 М трис-боратном буфере, pH 8,3, содержащем 1 мМ EDTA и 8,5 М мочевины.

Алкилирование остатков цитидина проводили диметилсульфатом так же, как и в случае алкилирования остатков гуанозина. Затем алкилированную тРНК растворяли в 10 мкл 50% водного раствора гидразина и инкубировали 5 мин при 0° С. Затем тРНК дважды пересаждали этанолом из 200 мкл 0,3 М ацетата натрия, pH 4,5, содержащего 1·10⁻⁴ М EDTA. Разрыв полинуклеотидной цепи по модифицированным остаткам G и C (и U — см. ниже) индуцировали анилином.

При модификации тРНК гидразином идет также модификация остатков уридина. Для того чтобы вычленишь электрофоретические полосы, соответствующие олигонуклеотидам, которые оканчиваются уридином, тРНК (0,1 мкг) растворяли в 10 мкл 50% водного раствора гидразина, инкубировали при 0° С 10 мин, а затем дважды пересаждали спиртом. Разрыв полинуклеотидной цепи индуцировали анилином.

В денатурирующих условиях модификацию аденозина проводили в 200 мкМ 0,05 М каодилата натрия, pH 7,0, содержащего 1 мМ EDTA, при 90°С в течение 1 мин. Диэтилпинокрбонат добавляли в объеме 5 мкл. Для модификации в полуденатурирующих условиях тРНК инкубировали в этом же буфере, но при более низких температурах. Реакцию останавливали осаждением спиртом с добавлением 20 мкг 5S РНК в качестве носителя. Разрыв полинуклеотидной цепи анилином и дальнейший анализ полученных фрагментов проводили как описано для остатков гуанозина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Suddath F. L., Quigley G. J., McPherson A., Sneden D., Rich A. // Nature. 1974. V. 248. № 5443. P. 20–24.
2. Robertus J. D., Ladner J. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R. S., Clark B. F. C., Klug A. // Nature. 1974. V. 250. № 5467. P. 546–551.
3. Schevitz R. W., Podjarny A. G., Krishnamachari N., Hughes J. J., Sigler P. // Nature. 1979. V. 278. № 5700. P. 188–190.
4. Woo N. H., Roe B. A., Rich A. // Nature. 1980. V. 286. № 5700. P. 346–351.
5. Moras D., Comarmond M. B., Fisher J., Weiss R., Thierry J.-C., Ebel J.-P., Giege R. // Nature. 1980. V. 288. № 5783. P. 669–674.
6. Peattie D. A., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 8. P. 4679–4682.
7. Rietveld K., Pleij C. W. A., Bosch L. // EMBO J. 1983. V. 2. № 7. P. 1079–1085.
8. Swerdlow H., Guthrie Ch. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 8. P. 5197–5207.
9. Kjems J., Olesen S., Garrett K. A. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 2. P. 241–250.
10. Giege R., Romby P., Florents C., Ebel J.-P., Dumas P., Westhof E., Moras D. // Nucleic acids: The vectors of life/Eds Pullman B., Jortner J. Tel Aviv: Reidel Publ. Company, 1983. P. 415–426.
11. Петрушенко З. М., Тукало М. А., Мацука Г. Х. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1492–1497.
12. Teeter M., Quigley G., Rich A. // Metal ions in genetics information transfer. Amsterdam: Elsevier, 1981. P. 233–272.
13. Brennan T., Sundaralingam M. // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. № 11. P. 3235–3251.
14. Тукало М. А., Васильева И. Г., Турковская Г. В., Ельская А. В. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 12. С. 1984–1987.
15. Silberklang H., Gillum A. H., Rajzhandary U. L. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 12. P. 4091–4108.
16. Vlassov V., Giege R., Ebel J.-P. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 119. № 1. P. 51–59.
17. Donis-Keller H., Mazam A. M., Gilbert W. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 8. P. 2527–2538.

Поступила в редакцию
3.III.1987
После доработки
2.VII.1987

A STUDY OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF tRNA^{Leu}_{IAG} FROM COW MAMMARY GLAND BY THE CHEMICAL MODIFICATION METHODS

PETRUSHENKO Z. M., TUKALO M. A., MATSUKA G. Kh.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev*

The nucleosides of tRNA^{Leu}_{IAG} (with a long variable loop) from the cow mammary gland included in formation of the three-dimensional structure have been analysed by the chemical modification methods. Exposed guanosine and cytidine residues were detected by means of dimethylsulfate, whereas diethylpyrocarbonate was used to detect exposed adenosine residues.

The low level of the modification was characteristic of guanosine residues in positions 10, 13, 15, 23, 24, 29, 30, 47 H, 51, 52, 53, 57; of cytidine residues in positions 48, 56 and those involved in Watson – Crick pairing; of adenosine residues in positions 14, 22, 31, 42, 59, 64. Most bases of tRNA^{Leu}_{IAG} thus detected are similarly located in the yeast tRNA^{Phe} molecule, which suggests a common role of these bases in the formation of the spacial structure of both tRNAs.