



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 \* № 6 \* 1980

УДК 547.963.32.04+577.157.6

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ тРНК, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА АМИНООКСИБУТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ, ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МЕТИЛАЗ С тРНК

*Гамбарян А. С., Венкстерн Т. В., Недоспасов А. А.,  
Хомутов Р. М.*

*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Исследовали комплексообразование тРНК-метилаз с тРНК, иммобилизованными на аминооксибутилцеллюлозе различными способами. Определены участки тРНК, вовлеченные в связь с носителем при образовании разных аффинных сорбентов. Показано, что комплексообразование происходит только на тРНК, иммобилизованной за 3'-конец, иммобилизация за антикодоновую петлю лишает молекулу тРНК способности образовывать комплексы с тРНК-метилазами. Высказано предположение, что антикодоновая петля в отличие от акцепторного конца входит, по-видимому, в участок, необходимый для связывания тРНК-метилаз.

Ранее нами было показано, что иммобилизованные на аминооксибутилцеллюлозе (АБЦ) тРНК могут с успехом использоваться не только для очистки тРНК-метилаз, но и для изучения особенностей процесса узнавания тРНК этими ферментами [1]. В настоящей работе мы использовали АБЦ, на которой были иммобилизованы как нативные тРНК (тРНК-АБЦ-II), так и тРНК, окисленные по 3'-концу (тРНК-АБЦ-I). Поскольку АБЦ, присоединенная к определенному участку молекулы тРНК, очевидно, должна влиять на стерическую доступность этого участка, появилась возможность оценить значение отдельных участков тРНК для комплексообразования и протекания ферментативной реакции. Для дальнейшего использования этого подхода необходимо было определить те участки иммобилизованной тРНК, которые вовлечены в связь с АБЦ, чему и посвящена настоящая работа.

Способ иммобилизации на АБЦ, окисленной по 3'-концу тРНК, основан на реакции окисленных периодатом производных рибозы с О-замещенными гидроксиламинаами [2]. Возможность образования ковалентных связей между нативной тРНК и АБЦ, т. е. получение тРНК-АБЦ-II, следовала из известных опытов по модификации нативной тРНК О-замещенными гидроксиламинаами [3, 4]. Однако как в первом, так и во втором случаях взаимодействие тРНК с высокомолекулярным, насыщенным функциональными группами сорбентом могло протекать существенно иным образом, чем реакции окисленной или нативной тРНК с О-метилгидроксиламином. Поэтому на основании известных данных о реакционной способности определенных оснований в тРНК можно было лишь предполагать, что АБЦ

Принятые сокращения: АБЦ – аминооксибутилцеллюлоза, тРНК-АБЦ-I и тРНК-АБЦ-II – АБЦ с привязанной окисленной (I способ) и неокисленной (II способ) тРНК, рРНК-АБЦ – АБЦ с привязанной рРНК.

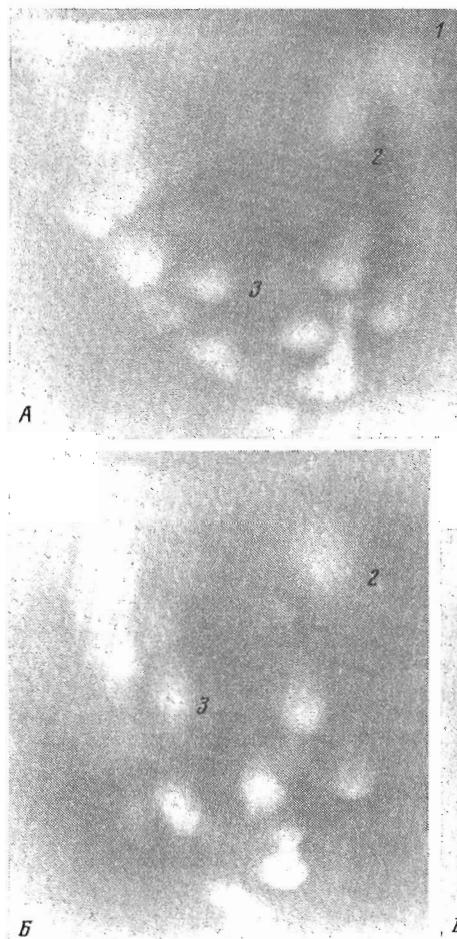


Рис. 1. Фингерпринты гуанил-РНКазных гидролизатов дрожжевой тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> (A); тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>-АБЦ-І (B); тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>-АБЦ-ІІ (B). Пятна на фингерпринтах соответствуют: 1 — А-А-А-У-С-А-С-С-А; 2 — А-С-А-С-Г; 3 — Д-С-Г

будет реагировать с окисленной тРНК по 3'-концу, а с нативной тРНК — по экспонированным остаткам цитидина антикодоновой петли, С-С-А-конца или дигидроуридиловой петли.

Настоящая работа проведена с целью идентификации тех участков молекулы тРНК, через которые она связывается с АБЦ, на примере тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> из дрожжей. Для этого сорбенты с тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>, иммобилизованной двумя способами, подвергали гидролизу РНКазой  $T_1$ . Гидролизаты фракционировали методом двумерной тонкослойной хроматографии и полученные фингерпринты сравнивали между собой и с фингерпринтом гидролизата свободной валиновой тРНК (рис. 1), считая, что олигонуклеотид, через который тРНК иммобилизуется на сорбенте, останется связанным с последним и будет отсутствовать в гидролизате.

Использование иммобилизованных на АБЦ нуклеиновых кислот для изучения белково-нуклеиновых взаимодействий основано по существу на том, что экранирование сорбентом определенного участка нуклеиновой кислоты сказывается на способности последней связываться с белком и образовывать с ним продуктивные комплексы. Действительно, в нашем случае из двух образцов иммобилизованных тРНК комплекс с тРНК-метилазами образует только тРНК-АБЦ-І. Очевидно, аналогичная ситуация в принципе могла иметь место и в случае взаимодействия этих двух сорбентов с нуклеазами, несмотря на разницу в молекулярных весах нуклеаз и тРНК-метилаз. В специальной серии экспериментов нами было показано,

Таблица 1

Идентификация олигонуклеотидов, полученных в результате гидролиза свободной и иммобилизованной тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> (рис. 1A—B)

Пятно	Растворитель *	<i>R<sub>f</sub></i>		
		Фингерпринт		
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
1 2	I	0,59	—	0,61
		0,52	0,5	—
1 2	II	0,06	—	0,05
		0,15	0,13	—

\* Растворители: I — изомасляная кислота — 0,5 М НН<sub>4</sub>ОН, 1:1, рН 3,7; II — 0,075 М НСООН — трет-бутиanol, 1:1, рН 4,8.

Таблица 2

Связывание метилаз с нативной тРНК (1) и тРНК с отщепленным С-С-А-концом (2), иммобилизованными на АБЦ разными способами\*

Метилазы, образующие	тРНК-АБЦ-I		тРНК-АБЦ-II	
	1	2	1	2
m <sup>5</sup> C	0,5	0,2	0	0
m <sup>1</sup> G	0,5	0,2	0	0
m <sup>7</sup> G	0,5	0,2	0	0
m <sup>1</sup> A	1,5	0,8	0	0
m <sup>2</sup> G	0,3	0,3	0	0
m <sup>2</sup> G	8,6	5,4	0,5	0

\* Связывание метилаз выражено в условных единицах ферментативной активности.

что при длительных временах инкубации и избытке РНКаз гидролиз тРНК, иммобилизованной обоими способами, может быть доведен практически до конца. Подтверждением этого является наличие на фингерпринтах всех пятен, кроме одного. Таким образом, фиксированная на АБЦ тРНК доступна для РНКаз, т. е. сорбент не создает пространственных препятствий для комплексообразования тРНК с низкомолекулярными белками. Следовательно, приведенная схема анализа правильна.

На рис. 1A приведен фингерпринт гидролизата тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> РНКазой Т<sub>1</sub>. Как было установлено при изучении первичной структуры тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> [5], пятно 1 этого фингерпринта (рис. 1) соответствует концевому олигонуклеотиду А-А-А-U-C-A-C-C-A, а пятно 2 — олигонуклеотиду А-C-A-C-G, расположенному в антикодоновой петле. Как показывает рассмотрение фингерпринтов, представленных на рис. 1B, B, в гидролизатах тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>-АБЦ-I и тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>-АБЦ-II отсутствуют по одному из этих пятен. Визуальная оценка расположения пятен, а также расчет их подвижности в двух хроматографических системах, использованных для фракционирования (табл. 1), говорят о том, что в гидролизате (рис. 1B) отсутствует концевой олигонуклеотид, тогда как в гидролизате тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>-АБЦ-II (рис. 1B) он

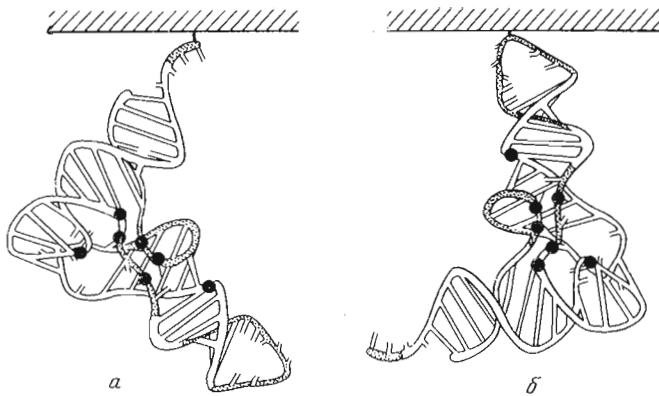


Рис. 4. Ориентация окисленной (а) и неокисленной тРНК (б) на АБЦ. Отмечены основные места расположения метилированных нуклеотидов

к АБЦ двух препаратов суммарной тРНК *E. coli* — нативной тРНК и тРНК, у которой методом последовательной деградации [6] были отщеплены три нуклеотида Ado, CydP и CydP с 3'-конца молекулы. Как видно на рис. 2, скорость иммобилизации тРНК, лишенной С-С-А-конца, практически совпадает с таковой для нативного препарата. Это свидетельствует в пользу того, что связывание неокисленной тРНК с АБЦ по остаткам цитидина 3'-конца если и имеет место, то лишь в незначительной степени. Таким образом, учитывая, что самыми экспонированными участками молекул тРНК являются акцепторный конец и антикодоновая петля, а по первому реакция привязки почти не идет, можно предположить, что подавляющее большинство молекул неокисленной суммарной тРНК иммобилизовано, также как и в случае валиновой тРНК, за остатки цитидина антикодоновой петли. Те же виды тРНК, у которых в антикодоновой петле нет цитидина (а таких очень немногого), либо не успевают привязаться к АБЦ за время реакции (так как из наших результатов следует, что скорость иммобилизации по другим местам значительно ниже, чем скорость иммобилизации по антикодоновой петле), либо составляют небольшую примесь молекул, привязанных за остатки цитидина акцепторного конца.

Для изучения комплексообразования метилаз с тРНК, иммобилизованными на АБЦ, необходимо было найти условия, в которых сорбция осуществлялась бы преимущественно по аффинному принципу, а неспецифические ионные взаимодействия были бы минимальны. Как известно, тРНК-метилазы отличаются строгой субстратной специфичностью — молекулы других РНК и даже половинки молекул тРНК не только не метилируются сами, но и не ингибируют реакции с нормальным субстратом, т. е. не обладают сродством к ферменту [7]. Следовательно, рРНК, иммобилизованная на АБЦ (рРНК-АБЦ), не может связывать метилазы по аффинному принципу, но может сорбировать все белки, в том числе и метилазы, благодаря неспецифическим ионным взаимодействиям. Как показали наши опыты (рис. 3), начиная с pH 7,3 сорбция метилаз на рРНК-АБЦ надает практически до нуля, а на тРНК-АБЦ-I остается высокой. Можно считать, что в этих условиях сорбция идет преимущественно за счет аффинного связывания, причем, как показали наши опыты [1], в этих условиях метилазы не только образуют комплекс с привязанной за окисленный 3'-конец тРНК, но и могут осуществлять реакцию ее метилирования. Исходя из этих данных, все опыты по сравнению связывания метилаз на сорбентах с окисленной и неокисленной тРНК мы проводили при pH 7,5.

Как было показано ранее [8], сорбент тРНК-АБЦ-II практически не связывает метилазы. Мы дополнili эти данные сравнением связывающей

способности образцов тРНК-АБЦ-I и тРНК-АБЦ-II, в которых привязанные тРНК были лишены С-С-А-конца (табл. 2). Очевидно, окисленная тРНК была иммобилизована при этом на АБЦ за четвертый с 3'-конца нуклеотид, а неокисленная тРНК — за остатки цитидина антикодоновой петли. Как показывает сравнение цифр первого и второго столбца табл. 2, отщепление трех нуклеотидов с 3'-конца несколько понижает способность тРНК, привязанной по 3'-концу, сорбировать метилазы, однако в принципе эта способность сохраняется для всех исследованных метилаз. Таким образом, акцепторный конец не является, очевидно, тем участком молекулы тРНК, который необходим для связывания метилаз, тогда как блокирование антикодоновой петли делает иммобилизованную тРНК недоступной для них. Согласно нашим данным, на первом этапе взаимодействия фермент узнает третичную структуру тРНК, подобную для всей популяции этого класса молекул [1]. Так же как и в случае синтетаз [9], на поверхности молекулы тРНК можно представить себе протяженную область, далеко выходящую за пределы места будущего метилирования, по которой осуществляются первичные контакты фермента с субстратом. В случае, если привязка к матрице идет по пуклеотидам, входящим в эту область, или если поверхность матрицы экранирует ее, образование фермент-субстратного комплекса становится невозможным (рис. 4). Не исключено, что структура места последующего метилирования не столь критична для образования комплекса, как строение каких-либо других участков молекулы. Так, согласно нашим данным, такие разные молекулы, как серишовая тРНК, имеющая длинную дополнительную ветвь, и валиновая, фенилаланиновая и другие, имеющие короткую дополнительную петлю, образуют комплексы с одними и теми же метилазами, причем с такими, которые проводят метилирование в этой, столь сильно различающейся области ( $m^5C$ - и  $m^7G$ -метилазами) [1]. В то же время экранировка антикодоновой петли сделала невозможным образование комплекса со всеми изучаемыми метилазами. Нельзя, однако, исключить и другие объяснения. Возможно, что экранировка антикодоновой петли затрудняет доступ метилазы к «контактной площадке» на тРНК или что фиксирование молекулы тРНК за антикодоновую петлю уменьшает степень свободы молекулы и приводит к такому изменению нативной третичной структуры тРНК, что ее комплексирование с ферментом становится невозможным.

Как следует из всего вышесказанного, в поведении разных метилаз обнаруживаются общие закономерности. Все они образуют комплексы практически с любой тРНК, для всех антикодоновая петля является, по-видимому, необходимым участком связывания, а акцепторный триплет не является существенным. Далее, метильные группы в молекулах разных тРНК расположены единообразно, и притом кучно на одной стороне молекулы. Можно думать, что метилазы, составляя родственную группу ферментов и образуя комплексы с разными, но подобными по третичной структуре молекулами тРНК, взаимодействуют с пими сходным образом.

## Экспериментальная часть

тРНК<sub>I</sub><sup>Val</sup> выделена в лаборатории функциональной энзимологии ИМБ АН СССР. Суммарная субметилированная тРНК из *E. coli* выделена из ауксотрофного по метионину штамма K-12 58161. [<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>]-S-аденозилметионин (уд. акт. 54 Ки/моль) фирмы Amersham (США). АБЦ синтезировали как описано в работе [10], а иммобилизацию окисленной и неокисленной тРНК проводили согласно [8].

*Определение участков молекулы, через которые происходит связывание тРНК с АБЦ.* В работе использовали тРНК<sub>I</sub><sup>Val</sup> из дрожжей. После посадки последней сорбенты промывали буфером 10 мМ три, 1 мМ EDTA, рН 7,4, и добавляли РНКазу T<sub>1</sub> (Sigma) из расчета 10 единиц фермента на 1 ОЕ<sub>260</sub>

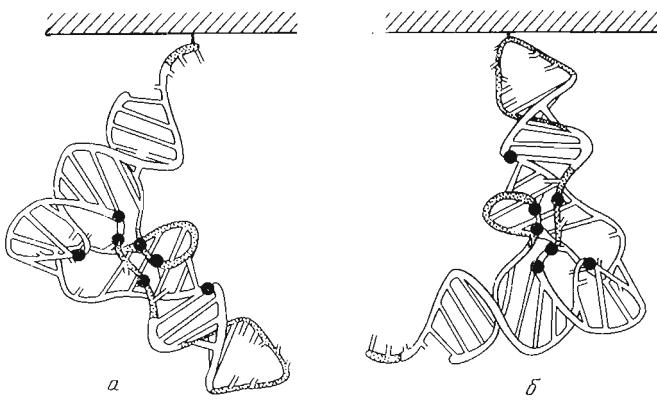


Рис. 4. Ориентация окисленной (а) и неокисленной тРНК на АБЦ. Отмечены основные места расположения метилированных нуклеотидов

к АБЦ двух препаратов суммарной тРНК *E. coli* — нативной тРНК и тРНК, у которой методом последовательной деградации [6] были отщеплены три нуклеотида Ado, CydP и CydP с 3'-конца молекулы. Как видно на рис. 2, скорость иммобилизации тРНК, лишенной С-С-А-конца, практически совпадает с таковой для нативного препарата. Это свидетельствует в пользу того, что связывание неокисленной тРНК с АБЦ по остаткам цитидила 3'-конца если и имеет место, то лишь в незначительной степени. Таким образом, учитывая, что самыми экспонированными участками молекул тРНК являются акцепторный конец и антикодоновая петля, а по первому реакция привязки почти не идет, можно предположить, что подавляющее большинство молекул неокисленной суммарной тРНК иммобилизовано, так же как и в случае валиновой тРНК, за остатки цитидина антикодоновой петли. Те же виды тРНК, у которых в антикодоновой петле нет цитидина (а таких очень немного), либо не успевают привязаться к АБЦ за время реакции (так как из наших результатов следует, что скорость иммобилизации по другим местам значительно ниже, чем скорость иммобилизации по антикодоновой петле), либо составляют небольшую примесь молекул, привязанных за остатки цитидина акцепторного конца.

Для изучения комплексообразования метилаз с тРНК, иммобилизованными на АБЦ, необходимо было найти условия, в которых сорбция осуществлялась бы преимущественно по аффинному принципу, а неспецифические ионные взаимодействия были бы минимальны. Как известно, тРНК-метилазы отличаются строгой субстратной специфичностью — молекулы других РНК и даже половники молекул тРНК не только не метилируются сами, но и не ингибируют реакции с нормальным субстратом, т. е. не обладают сродством к ферменту [7]. Следовательно, рРНК, иммобилизованная на АБЦ (рРНК-АБЦ), не может связывать метилазы по аффинному принципу, но может сорбировать все белки, в том числе и метилазы, благодаря неспецифическим ионным взаимодействиям. Как показали наши опыты (рис. 3), начиная с pH 7,3 сорбция метилаз на рРНК-АБЦ падает практически до нуля, а на тРНК-АБЦ-I остается высокой. Можно считать, что в этих условиях сорбция идет преимущественно за счет аффинного связывания, причем, как показали наши опыты [1], в этих условиях метилазы не только образуют комплекс с привязанной за окисленный 3'-конец тРНК, но и могут осуществлять реакцию ее метилирования. Исходя из этих данных, все опыты по сравнению связывания метилаз на сорбентах с окисленной и неокисленной тРНК мы проводили при pH 7,5.

Как было показано ранее [8], сорбент тРНК-АБЦ-II практически не связывает метилазы. Мы дополнили эти данные сравнением связывающей

иммобилизованной тРНК. Ихкубацию проводили 5 ч при 37° С. Параллельно подвергали гидролизу свободную тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup>. Гидролизаты, отделенные от сорбентов центрифугированием, упаривали до 10 мкл и фракционировали в тонком слое целлюлозы (FND, Filtrak) двумерным способом в системах: изомасляная кислота — 0,5 М NH<sub>4</sub>OH, 10 : 6, pH 3,7 (I), 0,075 М HCOOH — трет-бутиanol, 1 : 1, pH 4,8 (II). После разделения соответствующие олигонуклеотиды элюировали с пластинок целлюлозы и идентифицировали. Для этого проводили их гидролиз РНКазой А (Reanal) в 0,04 М бикарбонате натрия, pH 7,5, при 37° С в течение 24 ч, а продукты гидролиза фракционировали в тонком слое целлюлозы, используя растворитель II.

*tRNK*-метилазы (*S*-аденозил-L-метионин : *tRNK*-метилтрансферазы, КФ 2.1.1) выделяли в виде фракции белка, осаждающей при 60% насыщения сульфатом аммония супернатанта нефромы крысы, полученного при 105000 g. Осадок растворяли в буферном растворе 10 mM три, 1 mM EDTA, 1 mM дитиотреата, 0,3 M ацетата аммония, pH 7,5 (в отдельных опытах pH варьировали).

Сорбцию метилаз осуществляли, пропуская 1 мл ферментного раствора (4 мг белка) через колонки с внутренним диаметром 4 мм и высотой 15 мм со скоростью 4 мл/ч, промывали колонки 5 мл исходного буфера, а затем элюировали связавшиеся метилазы тем же буфером, содержащим 0,5 M NaCl. Все работы с ферментом проводили при 4° С. Определение суммарной активности, а также активности отдельных метилаз в исходном ферментном препарате и в элюатах с колонок проводили как описано ранее [8]. Последовательное отщепление нуклеотидов от 3'-конца тРНК проводили по методу Ноя и Хеппеля [6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gambaryan A. S., Morozov I. A., Venkstern T. V., Bayev A. A. (1979) Nucl. Acids Res., 6, 1001–1011.
2. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1978) Биоорганическая химия, 4, 645–653.
3. Budovsky E. I., Sverdlov E. D., Monastyrskaia G. S. (1969) J. Mol. Biol., 44, 205–207.
4. Жиляева Т. И., Киселев Л. Л. (1972) Молекулярная биология, 6, 254–263.
5. Венкстери Т. В., Ли Л., Крутилина А. И., Аксельрод В. Д., Мирзабеков А. Д., Баев А. А. (1968) Молекулярная биология, 2, 597–611.
6. Neu H. C., Heppel L. A. (1964) J. Biol. Chem., 239, 2927–2934.
7. Венкстери Т. В., Шершиева Л. П., Баев А. А. (1974) в кн.: Структура и функция нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, с. 21–22, Изд-во МГУ.
8. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М., Гамбарян А. С., Морозов И. А., Венкстери Т. В. (1978) Молекулярная биология, 12, 1105–1112.
9. Rich A. (1974) Biochimie, 56, 1441–1449.
10. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1136–1141.

Поступила в редакцию  
12.XI.1979

#### USE OF tRNAs IMMOBILIZED ON AMINOHYDROXYBUTYLCELLULOSE FOR STUDYING THE COMPLEX FORMATION BETWEEN METHYLASES AND tRNAs

GAMBARYAN A. S., VENKSTERN T. V., NEDOSPASOV A. A., KHOMUTOV R. M.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The complex formation between tRNA and tRNA methyltransferase (E.C. 2.1.1) was studied using tRNAs immobilized on aminohydroxybutylcellulose. The tRNA sites involved in binding with the carrier in formation of various affinity sorbents were determined. It was shown that complex formation occurs only on tRNAs immobilized via their oxidized 3'-termini, whereas the immobilization via the anticodon loop completely abolishes the binding of methylases. A suggestion is made that the anticodon loop, in contrast to the acceptor end of the tRNA molecules, participates in the binding of methyltransferases.