

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДВУХ тРНК С КОМПЛЕМЕНТАРНЫМИ  
АНТИКОДОНАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ

Модельная система из двух тРНК, взаимодействующих взаимно комплементарными антикодонами, позволяет имитировать кодон-антикодоновое взаимодействие тРНК с мРНК на рибосоме. Впервые комплексы [тРНК•тРНК] наблюдались Эйзингером, а подробное изучение процесса формирования комплекса из двух тРНК было проведено Грожаном с соавт. [1] на примере взаимодействия дрожжевой tRNA<sup>Phe</sup> (антикодон G<sub>m</sub>AA) и tRNA<sup>Glu</sup> (антикодон mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>UUC) из *E. coli*. Такая модель позволяет изучать влияние оснований, находящихся в непосредственной близости к антикодону тРНК, на термодинамику антикодон-антикодонового взаимодействия.

В дрожжевой tRNA<sup>Phe</sup> с 3' стороны от антикодона G<sub>m</sub>AA присутствует Y-основание, которое является природным флуорофором [2]. При "антикодон-антикодоновом" взаимодействии tRNA<sup>Phe</sup> с tRNA<sup>Glu</sup> происходит сближение Y-основания в 37 положении tRNA<sup>Phe</sup> с модифицированным урацилом в 34 положении tRNA<sup>Glu</sup> из *E. coli*, вследствие чего серосодержащая модификация последнего выступает в роли гасителя флуоресценции Y-основания. За образованием такого бинарного комплекса [tRNA<sup>Phe</sup>•tRNA<sup>Glu</sup>] можно следить по уменьшению флуоресценции Y-основания дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup>.

Целью данного исследования было определение термодинамических параметров реакции связывания дрожжевой tRNA<sup>Phe</sup> и ее производных с комплементарной tRNA<sup>Glu</sup> из *E. coli* флуоресцентным методом.

Полученное значение константы диссоциации комплекса [tRNA<sup>Phe</sup><sub>Y</sub>•tRNA<sup>Glu</sup>] при 20°C, K<sub>d</sub>=1,0±0,2 μM, находится в хорошем соответствии с литературными данными [1], [3]. Результаты измерений флуоресценции при конкурентном взаимодействии tRNA<sup>Phe</sup><sub>Y</sub> и tRNA<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub> с tRNA<sup>Glu</sup><sub>E.coli</sub> показали, что отщепление Y-основания в tRNA<sup>Phe</sup> приводит к значительному росту K<sub>d</sub> (до 9±3 μM при 20°C). В то же время, полученные данные в диапазоне температур от 15 до 37 °C указывают на роль энтропийного члена свободной энергии в изменении константы равновесия реакции tRNA<sup>Phe</sup><sub>Y</sub> с tRNA<sup>Glu</sup> по сравнению с tRNA<sup>Phe</sup><sub>yeast</sub>.

Флуоресцентномеченые тРНК можно использовать также для изучения молекулярного механизма программируемого сдвига рамки считывания на рибосоме. Предполагается, в частности, сравнить стабильности полученных в рибосоме пептидил-тРНК<sup>Lys</sup> на AAA и AAG кодонах в А и Р сайтах методом диссоциации, т.е. измерением флуоресценции тРНК по мере ее ухода из соответствующих пре- и посттранслокационных комплексов в раствор. В рамках этого проекта приготовлена флуоресцентномеченая тРНК<sup>Lys</sup> (prf16/17/20), где дигидроуридины в 16, 17 и 20 положениях D-петли этой тРНК замещены на флуорофор профлавин по методике, описанной в [4]. Флуоресцентномеченая тРНК<sup>Lys</sup> (prf16/17/20) аминоацелирована [<sup>14</sup>C] лизином и конечный препарат [<sup>14</sup>C]Lys-тРНК<sup>Lys</sup> (prf16/17/20) очищен с использованием HPLC.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Grosjean, H., Soll, D.G., Crothers, D.M. J. Mol. Biol. – 1976. – Vol. 103, N 3. – P. 499-519.
2. Esinger, J., Feuer, B., Yamane, T. Proceedings of the National Academy of Sciences – 1970. – Vol. 65, N 3. – P. 638-644.
3. A.L.Konevega, N.G.Soboleva, V.I.Makhno, A.V.Peshekhonov, and V.I.Katunin. J. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 40, No 4. – P. 0026-8933
4. W.Wintermeyer, H.G.Zachau (1979). Eur.J.Biochem. 98, 465-475.