

Кинетические параметры аминоацилирования тРНК^{Тур}-транскрипта тирозил-тРНК синтетазой из печени быка

В. Г. Найденов, М. И. Вудмаска, Г. Х. Мацука

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Полноразмерная тирозил-тРНК синтетаза из печени быка и тирозил-тРНК синтетаза с делецией С-концевого некаталитического домена экспрессированы в бактериальной системе. Для двух форм фермента проведено сравнение кинетических констант реакции аминоацилирования. Показано, что каталитическая эффективность в тирозилировании природной тРНК^{Тур} и тРНК^{Тур}-транскрипта с удалением С-концевого домена снижается в 4 и 18 раз соответственно. Отмечено, что при аминоацилировании тРНК^{Тур}-транскрипта снижение каталитической эффективности связано в основном с увеличением K_m . Высказано предположение о том, что роль С-концевого домена в аминоацилировании состоит в повышении прочности связывания тРНК с ферментом.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы (АРСаза, КФ 6.1.1), катализируя реакцию аминоацилирования тРНК, играют ключевую роль в декодировании генетической информации [1–3]

Точность аминоацилирования контролируется РНК-белковыми взаимодействиями, среди которых различают специфические (между боковыми цепями аминокислот и функциональными группами оснований РНК) и неспецифические (между боковыми цепями аминокислот и рибозо-фосфатным остовом РНК).

АРСаза первого класса состоит из двух основных доменов, соответствующих N- и С-концевым частям белковой молекулы. Структурная организация N-концевого домена в значительной степени одинакова для всех изученных ферментов. Он сформирован чередующимися α -спиралями и β -слоями (свертка Россмана) [4], образующими активный центр синтеза аминоациладенилата и переноса аминокислоты на 3'-конец тРНК. N-концевой домен связывает акцепторный стебель тРНК [5, 6].

С-концевой домен менее универсален по

структурной организации. В реакции аминоацилирования он взаимодействует с другими участками тРНК, в частности, с антикодоновой ветвью [7–10].

Ряд эукариотических АРСаз, кроме перечисленных выше двух основных доменов, содержат еще один дополнительный некаталитический домен, располагающийся на N- или С-конце молекулы фермента и отсутствующий у их прокариотических аналогов [11, 12]. Функция дополнительного домена до конца не выяснена, однако показано, что он обладает неспецифической РНК-связывающей активностью [13] и участвует в белково-белковых взаимодействиях [14]. Влияние дополнительного некаталитического домена на аминоацилирующую активность остается предметом изучения. Показано, например, что некаталитический домен повышает активность MetPC из риса [15], тогда как на активность GluPC из дрожжей дополнительный домен не влияет [16].

Ранее нами клонирована тирозил-тРНК синтетаза (КФ 6.1.1.1) из печени быка [17, 18]. Анализ аминокислотной последовательности позволил установить наличие в составе фермента дополнительного С-концевого некаталитического домена, гомо-

логичного некаталитическим доменам метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз, а также белку Arg1p из дрожжей [19]. Показано, что этот домен определяет свойство ТурРС быка неспецифически связываться с высокомолекулярными РНК [20].

В данной работе мы экспрессировали в бактериальной системе полноразмерную тирозил-тРНК синтетазу и тирозил-тРНК синтетазу без дополнительного С-концевого домена и сравнили их активность в аминокислотировании природной и полученной транскрипцией *in vitro* тРНК^{Тур}.

Материалы и методы. *Клонирование, бактериальная экспрессия и очистка белков.* В работе использовали общепринятые методики молекулярного клонирования [21].

Фрагмент кДНК, кодирующий полноразмерную тирозил-тРНК синтетазу из печени быка (ТурРС) от сайта *NcoI* до сайта *NheI*, клонировали в бактериальный экспрессионный вектор *pET23d* («Novagen», США) по сайтам *NcoI-XhoI*. Для элиминации собственного стоп-кодона и совмещения рамок считывания тирозил-тРНК синтетазы и (His)₆-последовательности вектора выступающие концы сайтов *NheI* и *XhoI* после рестрикции были затуплены S1 нуклеазой. Фрагмент кДНК от сайта *NcoI* до сайта *Eco47III*, кодирующий аминокислотную последовательность тирозил-тРНК синтетазы Met1-Ser338 (ТурРС_{ΔC}), клонировали в тот же вектор по сайтам *NcoI-HincII*. Бактериальную экспрессию полученных плазмид (соответственно *pBYRS* и *pBYRS_{ΔC}*) проводили в клетках *Escherichia coli* BL-21 (DE3). Трансформированные клетки выращивали в среде LB с ампициллином до плотности 0,4 A₆₀₀ и индуцировали 0,5 мМ IPTG в течение 12 ч при температуре 20 °С. Клетки собирали центрифугированием, суспендировали в буфере PBS (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄) с 5 мМ фенилметилсульфонилфторидом, разрушали ультразвуком и осветленный лизат наносили на колонку с Ni-NTA сефарозой. Колонку промывали буфером PBS с 20 мМ имидазолом, после чего элюировали связавшийся белок тем же буфером с 100 мМ имидазолом. Очищенные ТурРС и ТурРС_{ΔC} хранили при температуре -20 °С в буфере: 30 мМ HEPES-KOH, pH 7,4, 5 мМ MgCl₂, 20 мМ KCl, 1 мМ DTT, 50 %-й глицерин.

Конструирование и транскрипция in vitro искусственного гена тРНК^{Тур} Искусственный ген тРНК^{Тур} быка получен, в основном, по методу, предложенному в [22], лигированием шести попарно-комплементарных олигонуклеотидов (рис. 1). Продукт лигирования длиной 104 п. н. после очистки препаративным электрофорезом в 2 %-м ага-

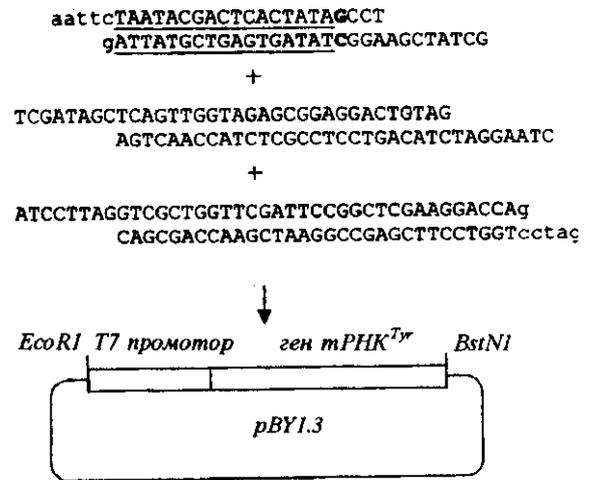


Рис. 1. Схема клонирования искусственного гена тРНК^{Тур}. Последовательность Т7-промотора подчеркнута, добавочный гуанозин на 5'-конце транскрипта выделен жирным шрифтом

розном геле клонировали в плазмиду *pUC19* по сайтам рестрикции *EcoRI-BamHI*. Соответствие нуклеотидной последовательности вставки первичной структуре тРНК^{Тур} быка подтверждено секвенированием обеих цепей рекомбинантной плазмиды. Линеаризованную рестрикцией *BstNI* плазмиду использовали в качестве ДНК-матрицы для «*run-off*» транскрипции. Стандартная реакционная смесь содержала в объеме 500 мкл: 40 мМ трис-НСl, pH 7,5, 50 мМ NaCl, 8 мМ MgCl₂, 2 мМ спермидин, 30 мМ DTT, рибонуклеозидтрифосфаты в концентрации 1 мМ каждый, 0,2 мкг/мкл линеаризованной плазмиды и 10 ед./мкл Т7-РНК полимеразы. Для очистки транскрипта применяли денатурирующий электрофорез в 15 %-м полиакриламидном геле. Полноразмерный транскрипт элюировали из геля буфером: 10 мМ трис-НСl, pH 7,0, 300 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, переосаждали этанолом и хранили при -50 °С в буфере: 10 мМ трис-НСl, pH 7,0, 1 мМ ЭДТА.

Реакция аминокислотирования. Перед аминокислотированием транскрипт ренатурировали прогреванием при температуре 80 °С в течение 2 мин с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры.

Реакцию аминокислотирования проводили в буфере: 30 мМ HEPES-KOH, pH 7,4, 2,5 мМ MgCl₂, 20 мМ KCl, 2 мМ DTT, 2 мМ АТФ, 30 мкМ [¹⁴C] тирозин (13320 МБк/ммоль). Кинетические пара-

метры тирозилирования определяли в присутствии 0,05—3 мкМ тРНК^{Tyr}-транскрипта (или 3—300 мкМ суммарной тРНК из дрожжей) и 0,03—0,4 мкМ тирозил-тРНК синтетазы при 37 °С. Реакцию останавливали, добавляя 10 объемов охлажденной 7 %-й трихлоруксусной кислоты, затем фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF-C и измеряли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике. Кинетические константы рассчитывали из графика Лайнуивера-Берка. Представлены средние константы, полученные, как минимум, в двух независимых экспериментах. Экспериментальная ошибка определения индивидуальных констант лежала в пределах 15—18 %.

Результаты и обсуждение. Клонирование и экспрессия *TyrPC* и *TyrPC_{ΔC}*. Тирозил-тРНК синтетазы из печени быка представляет собой димер α₂-типа и содержит на С-конце полипептидной цепи некаталитический домен, отсутствующий у прокариотического фермента. Анализ аминокислотной последовательности С-концевого домена [19] выявил гомологию с некаталитическими доменами метионил-тРНК синтетазы и β-субъединицы фенилаланил-тРНК синтетазы, а также с С-концевым участком белка Arg1p из дрожжей, функция которого [23] состоит в неспецифическом связывании тРНК и направлении их в активный центр соответствующей АРСазы.

Для выяснения роли С-концевого некаталитического домена *TyrPC* в аминокислотировании мы клонировали полноразмерную и укороченную с С-конца формы фермента в бактериальный экспрессионный вектор *pET23d*. Рекombинантный полноразмерный белок (*TyrPC*) с учетом нуклеотидной последовательности вектора имеет аминокислотную последовательность: Met1-Ile527Arg(His)₆. Молекулярная масса его, рассчитанная по аминокислотной последовательности, составляет 2 × 60 кДа. Укороченному белку (*TyrPC_{ΔC}*) в составе вектора соответствует открытая рамка считывания с аминокислотной последовательностью: Met1-Ser338AspLysLeuAlaAlaAlaLeuGlu(His)₆ и расчетная молекулярная масса 2 × 39,9 кДа. Экспрессированные в клетках BL-21(DE3) белки очищены до гомогенного состояния аффинной хроматографией на Ni-NTA сефарозе (рис. 2). Можно видеть, что электрофоретическая подвижность полученных белков находится в хорошем соответствии с расчетными молекулярными массами.

Транскрипция *in vitro* искусственного гена тРНК^{Tyr}. Искусственный ген тРНК^{Tyr} быка получен лигированием *in vitro* шести попарно-комплементарных олигонуклеотидов (рис. 1). Поскольку природная тРНК^{Tyr} содержит на 5'-конце цитозин,

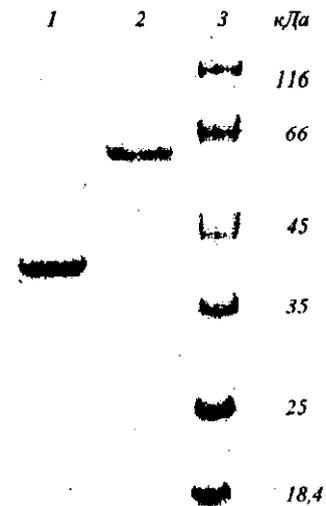


Рис. 2. Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле с DS-Na очищенных полноразмерной (*TyrPC*) и лишенной С-концевого домена (*TyrPC_{ΔC}*) тирозил-тРНК синтетаз: 1 — *TyrPC_{ΔC}*; 2 — *TyrPC*; 3 — маркеры молекулярной массы

а для эффективной работы Т7-РНК полимеразы транскрипт должен начинаться с пурина [24], в состав искусственного гена на 5'-конец тРНК был введен дополнительный гуанозин. Продукт лигирования клонировали в плазмиду *pUC19*, в результате чего получена плаزمида *pBY1.3*, содержащая полную нуклеотидную последовательность тРНК^{Tyr} быка с примыкающим к ней с 5'-конца промотором Т7-РНК полимеразы, а с 3'-конца — сайтом рестрикции *BstNI*. Линеаризация плазмиды по этому сайту приводит к образованию ДНК-матрицы с выступающим на 5'-конце (–)-цепи тимидином, комплементарным 3'-концевому аденозину тРНК.

В результате «гип-офф» транскрипции линеаризованной плазмиды и очистки электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле получен транскрипт, соответствующий полноразмерной тРНК^{Tyr}. Количественный выход реакции составлял в среднем 1 мкг очищенного транскрипта на 1 мкг ДНК-матрицы, а исчерпывающее аминокислотирование показало, что 80—90 % полученного транскрипта обладает акцепторной активностью.

Каталитические свойства *TyrPC* и *TyrPC_{ΔC}*. Для того чтобы проверить, не нарушает ли удаление С-концевого домена специфичность фермента, мы сравнили *TyrPC* и *TyrPC_{ΔC}* в реакции аминокислотирования суммарной тРНК из дрожжей. Выяснилось, что кинетические кривые включения тирозина в тРНК при насыщающих концентрациях

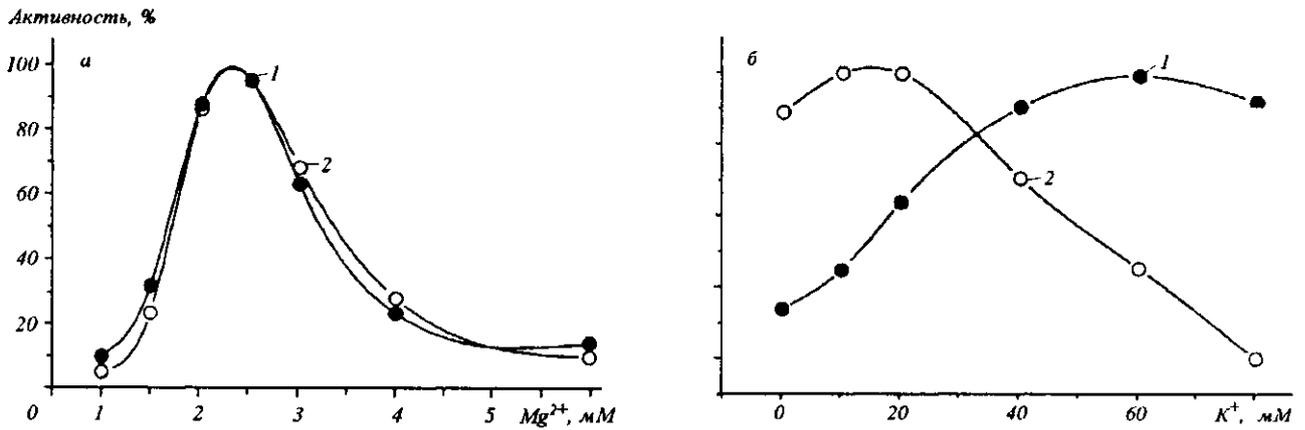


Рис. 3. Зависимость аминокцилирующей активности TygPC (1) и TygPC_{ΔC} (2) от концентрации Mg²⁺ (а) и K⁺ (б). Активности TygPC и TygPC_{ΔC} выражены в процентах от максимальной для каждого белка

ферментов достигают плато одинаковой величины (результаты не показаны), что свидетельствует о сохранении TygPC_{ΔC} специфичности по отношению к тирозиновой тРНК. В свою очередь, это означает, что удаление С-домена не затрагивает участков последовательности фермента, принимающих участие в специфических тРНК-белковых взаимодействиях.

Оба фермента показывают одинаковую зависимость аминокцилирующей активности от концентрации ионов Mg²⁺ в реакционной смеси (рис. 3, а). Максимальная начальная скорость аминокцилирования достигается при 2,5 мМ Mg²⁺ как для TygPC, так и для TygPC_{ΔC}. В то же время оптимальные концентрации ионов K⁺ для двух ферментов различны (рис. 3, б). Для TygPC_{ΔC} она составляет 15 мМ, тогда как полноразмерный фермент проявляет максимальную активность при 60 мМ K⁺. Такая разница в оптимальных концентрациях K⁺ может свидетельствовать об участии С-концевого некаталитического домена в ионных взаимодействиях с тРНК [15].

Кинетические константы реакции аминокцилирования для TygPC и TygPC_{ΔC} суммированы в таблице.

Из представленных данных следует, что каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) тирозил-тРНК синтетазы с deletированным С-концевым доменом ниже, чем полноразмерного фермента при аминокцилировании как природной тРНК, так и тРНК-транскрипта (таблица). Обращает на себя внимание, что TygPC_{ΔC} демонстрирует трехкратное снижение k_{cat} по сравнению с TygPC независимо от

Кинетические параметры тирозилирования суммарной тРНК из дрожжей и тРНК^{Tyr}-транскрипта для TygPC и TygPC_{ΔC}

| Фермент, тРНК | K _M , мкМ | k _{cat} , с ⁻¹ | k _{cat} /K _M , с ⁻¹ мкМ ⁻¹ |
|---------------------------------|----------------------|------------------------------------|--|
| <i>TygPC</i> | | | |
| тРНК ^{Tyr} дрожжей | 0,18 | 0,055 | 0,28 |
| тРНК ^{Tyr} -транскрипт | 0,24 | 0,03 | 0,125 |
| <i>TygPC_{ΔC}</i> | | | |
| тРНК ^{Tyr} дрожжей | 0,25 | 0,017 | 0,068 |
| тРНК ^{Tyr} -транскрипт | 1,48 | 0,01 | 0,007 |

субстрата. При этом удаление С-концевого домена оказывает различное влияние на изменение K_M для природной тРНК и тРНК-транскрипта. Если для природной тРНК K_M с удалением С-концевого домена увеличивается менее чем в 1,5 раза, то для тРНК-транскрипта наблюдается 6-кратное увеличение K_M. Соответственно и общее падение каталитической эффективности TygPC_{ΔC} по сравнению с TygPC в аминокцилировании тРНК-транскрипта оказывается более значительным (в 18 раз), чем в аминокцилировании природной тРНК (в 4 раза).

Приведенные результаты указывают на то, что некаталитический С-концевой домен эукариотической тирозил-тРНК синтетазы повышает каталитическую активность фермента. Учитывая тот факт,

что С-концевой домен обладает РНК-связывающими свойствами [20], можно предположить, что его роль состоит в увеличении прочности связывания тРНК и повышении, таким образом, локальной концентрации последней вблизи активного центра фермента. Менее выраженный эффект С-домена в аминоацилировании природной тРНК по сравнению с тРНК-транскриптом, возможно, объясняется тем, что природная дрожжевая тРНК^{Tyr} содержит модифицированные и минорные основания (в частности, в области антикодона), которые могут вносить определенный вклад в усиление связывания тРНК с ферментом, тем самым частично компенсируя отсутствие С-концевого домена у TyrPC_{ΔC}.

V. G. Naidenov, M. I. Vudmaska, G. Kh. Matsuka

Kinetic parameters of the tRNA^{Tyr} transcript aminoacylation by the bovine liver tyrosyl-tRNA synthetase

Summary

The full-length tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver and its truncated form without the C-terminal noncatalytic domain were expressed in a bacterial system. Both enzymes have been compared in respect of the aminoacylation kinetic constants. It has been shown that the catalytic efficiency of the yeast tRNA^{Tyr} and tRNA^{Tyr} transcript tyrosylation upon deletion of the C-terminal domain decreases by factors of 4 and 18 respectively. The catalytic efficiency decrease in the tRNA^{Tyr} transcript tyrosylation is mainly due to the increasing of K_M . We suggest that the C-terminal domain improves the aminoacylation activity of tyrosyl-tRNA synthetase by strengthening tRNA binding.

В. Г. Найденов, М. И. Вудмаска, Г. Х. Мащука

Кінетичні параметри аміноацилювання тРНК^{Tyr}-транскрипта тирозил-тРНК синтетазою з печінки бика

Резюме

Повнорозмірна тирозил-тРНК синтетаз з печінки бика і тирозил-тРНК синтетаз з делецією С-кінцевого некаталітичного домену експресовані в бактеріальній системі. Для двох форм ферменту здійснено порівняння кінетичних констант реакції аміноацилювання. Показано, що каталітична ефективність у тирозилуванні природної тРНК^{Tyr}, та тРНК^{Tyr}-транскрипта з видаленням С-кінцевого домену знижується в 4 і 18 разів відповідно. Відмічено, що при аміноацилюванні тРНК^{Tyr}-транскрипта зниження каталітичної ефективності пов'язане головним чином зі збільшенням K_M . Зроблено припущення, що роль С-кінцевого домену в аміноацилюванні полягає в підсиленні зв'язування тРНК з ферментом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schimmel P., Soll D. Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs // Annu. Rev. Biochem.—1979.—48.—P. 601—648.
- Киселев Л., Фаворова О., Лаврик О. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.—М.: Наука, 1984.—405 с.
- Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs // Annu. Rev. Biochem.—1987.—56.—P. 125—158.
- Rossmann M., Moras D., Olsen K. Chemical and biological evolution of nucleotide binding protein // Nature.—1974.—250.—P. 194—199.
- Fersht A., Knill-Jones J., Bedouelle H., Winter G. Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism // Biochemistry.—1988.—27.—P. 1581—1587.
- Rould M., Perona J., Soll D., Steitz T. Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Glu} and ATP at 2.8 Å resolution // Science.—1989.—246.—P. 1135—1142.
- Bedouelle H. Recognition of tRNA^{Tyr} by tyrosyl-tRNA synthetase // Biochimie.—1990.—72.—P. 589—598.
- Nureki O., Vassylyev D., Katayanagi K., Shimizu T., Sekine S., Kigawa T., Miyazawa T., Yokoyama S., Morikawa K. Architectures of class-defining and specific domains of glutamyl-tRNA synthetase // Science.—1995.—267.—P. 1958—1965.
- Mechulam Y., Schmitt E., Maveyraud L., Zelwer C., Nureki O., Yokoyama S., Konno M., Blanquet S. Crystal structure of *E. coli* methionyl-tRNA synthetase highlights species-specific features // J. Mol. Biol.—1999.—294.—P. 1287—1297.
- 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.—P. 2351—2361.
- Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: Structural domains and their implications // Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.—1991.—40.—P. 95—142.
- Wang C., Schimmel P. Species barrier to RNA recognition overcome with nonspecific RNA binding domains // J. Biol. Chem.—1999.—274.—P. 16508—16512.
- Alzhanova A., Fedorov A., Ovchinnikov L., Spirin A. Eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases are RNA-binding proteins whereas prokaryotic ones are not // FEBS Lett.—1980.—120.—P. 225—229.
- Kohda D., Yokoyama S., Miyazawa T. Functions of isolated domains of methionyl-tRNA synthetase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8 // J. Biol. Chem.—1987.—262.—P. 558—563.
- Kaminska M., Denizak M., Kerjan P., Barciszewski J., Mirande M. A recurrent general RNA binding domain appendent to plant methionyl-tRNA synthetase acts as a cis-acting cofactor for aminoacylation // EMBO J.—1999.—19.—P. 6908—6917.
- Ludmerer S., Schimmel P. Purification of glutamine tRNA synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. A monomeric aminoacyl-tRNA synthetase with a large and dispensable NH₂-terminal domain // J. Biol. Chem.—1993.—268.—P. 5519—5523.
- Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Одынец К. А., Корнелюк А. И., Мащука Г. Х. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка.—1996.—12.—С. 66—71.
- Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Корнелюк А. И., Мащука Г. Х. Клонирование кДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с использованием ПЦР-амплифицированного радио-

- активно меченного гибридизационного зонда // Биополимеры и клетка.—1997.—13.—С. 121—126.
19. Леванец О. В., Найденов В. Г., Одынец К. А., Вудмаска М. И., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином ЕМАР II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз // Биополимеры и клетка.—1997.—13.—С. 474—478.
20. Курочкин И. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК синтетазы с высокомолекулярными РНК // Молекуляр. биология.—1991.—25.—С. 61—67.
21. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
22. Sampson J., Uhlenbeck O. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 1033—1037.
23. Simos G., Sergef A., Fasiolo F., Hellmuth K., Shevchenko A., Mann M., Hurt E. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutaminyl-tRNA synthetases // EMBO J.—1996.—15.—P. 5437—5448.
24. Milligan J., Groebe D., Witherel G., Uhlenbeck O. Oligonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA template // Nucl. Acids Res.—1987.—15.—P. 8783—8798.

УДК 577.152.611:576.31
Надійшла до редакції 28.12.2000