

Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином ЕМАР II и некаталитическими доменами метионил- и фенилаланил-тРНК синтетаз

О. В. Леванец, В. Г. Найденов, К. А. Одынец, М. И. Вудмаска, Г. Х. Мацука, А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Тирозил-тРНК синтетаза млекопитающих содержит С-концевой домен, несущественный для каталитической активности фермента в реакции аминоацилирования гомологичной тРНК^{Тур}. кДНК, кодирующую тирозил-тРНК синтетазу млекопитающих, клонировали и секвенировали с использованием 3'-RACE метода. Сравнение аминокислотной последовательности С-домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с другими белками по программе BLASTP показало наиболее высокий уровень гомологии (62,7 % идентичности) с новым цитокином, индуцируемым при химическом канцерогенезе — ЕМАР II, соответствующем белку р43 высокомолекулярного комплекса АРСаз млекопитающих, а также с некаталитическими С-доменами метионил-тРНК синтетаз нематоды (62,7 %) и бактерий (27,7 %) и N-доменом β-субъединицы фенилаланил-тРНК синтетазы Escherichia coli (26,7 %). Предложена гипотеза о возможном образовании изолированного С-домена вследствие протеолитического расщепления тирозил-тРНК синтетазы внутриклеточными протеазами и проявлении этим доменом цитокин-подобной активности.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы (АРСазы, КФ 6.1.1) высших эукариот отличаются от их прокариотических аналогов наличием N- или С-концевых удлинений полипептидной цепи, необходимых для выполнения этими ферментами некоторых дополнительных функций, например, полианионсвязывающих свойств или участия в формировании высокомолекулярных комплексов АРСаз — кодосом [1—3].

Тирозил-тРНК синтетаза (КФ 6.1.1.1) из печени быка, выделенная и изученная нами ранее [4—6], представляет собой димер α_2 -типа с молекулярной массой (м. м.) 2×59 кДа. Наряду с основной формой синтетазы выделена и охарактеризована функционально активная протеолитиче-

ски модифицированная форма белка, имеющая м. м. 2×39 кДа [4—6]. Несущественное для каталитической активности фермента С-концевое удлинение полипептидной цепи вносит определяющий вклад в средство тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих к высокомолекулярным РНК [6].

Недавно нами клонирована и секвенирована кДНК, кодирующая С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих [7]. В данной работе представлен анализ гомологии полной аминокислотной последовательности некаталитического С-домена тирозил-тРНК синтетазы с другими белками, проведенный по программе BLASTP. Обнаружено, что С-домен бычьей тирозил-тРНК синтетазы имеет наиболее высокий уровень гомологии с новым цитокином, белком ЕМАР II, индуцируемым при химическом канцерогенезе [8—10], а также с некаталитическими С-доменом метионил-

тРНК синтетазы [11] и N-доменом β -субъединицы фенилаланил-тРНК синтетазы [12].

Материалы и методы. *Материалы.* В работе использовали клетки *Escherichia coli* XLI-Blue, плазмидный вектор pBluescript SK(+), обратную транскриптазу M-MLV и ДНК-полимеразу Pfu производства «Stratagene» (США), ДНК-полимеразу Taq и эндонуклеазы рестрикции производства «Bio-Master» (Россия). Праймеры для полимеразной цепной реакции синтезированы фирмой «MWG Biotech» (Германия). Для секвенирования ДНК использовали набор «Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit» («USB», США) и радиоактивный изотоп [^{35}S]dATP («Amersham», Англия).

Методы. Амплификация 3'-концевой последовательности кДНК, кодирующей тирозил-тРНК синтетазу (3'-RACE). Для получения полноразмерной кДНК, содержащей 3'-нетранслируемую область, проведена амплификация 3'-концевой последовательности кДНК по RACE-методу (Rapid Amplification of the cDNA Ends) [13] с некоторыми модификациями. кДНК синтезировали из 1 мкг поли(А)⁺РНК печени быка с использованием 10 пмоль праймера олиго(dT)-адаптора 5'-CTGGATCCGTCGACATCGAT(T)₁₅-3' при помощи M-MLV обратной транскриптазы по стандартной методике [14]. Аликвоты полученной кДНК применяли для двух последовательных раундов полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими (+)-праймерами SK6 5'-CTTTGCTGATGAGGTTGT-3' и SK8 5'-AAGGAGGAACTGCAGGAC-3' соответственно [7] и неспецифическим (-)-праймером-адаптором 5'-CAGGATCCGTCGACATCGAT-3'. Реакцию осуществляли в течение 35 циклов по программе: 1 мин при 94 °С, 1 мин при 60 °С и 1,5 мин при 72 °С.

Продукты ПЦР обрабатывали ДНК-полимеразой Pfu, и реакцию проводили в течение 30 мин при 72 °С по методике, описанной в [15]. После обработки ДНК-полимеразой Pfu продукты амплификации клонировали в вектор pBluescript SK(+) по сайту *EcoRV* и секвенировали по Сэнгеру [16].

Компьютерный анализ нуклеотидной и аминокислотных последовательностей. Полученные нуклеотидные и аминокислотные последовательности анализировали с использованием сетевого сервера программы BLAST [17]. Нуклеотидные последовательности кДНК проверяли, сопоставляя с базами данных нуклеотидных последовательностей: GenBankTM, версия 79.0, и EMBL, версия 36.0. Используя программу BLASTP [17], аминокислот-

ные последовательности сравнивали с базами данных белковых последовательностей: Swiss-Prot, версия 34.0, и PIR-NBRF, версия 38.0.

Выведение консенсусной последовательности кДНК тирозил-тРНК синтетазы человека по последовательностям, депонированным в базах данных. Вероятная полная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческую цитоплазматическую тирозил-тРНК синтетазу, выведена на основе последовательности для тирозил-тРНК синтетазы человека (GenBankTM Accession number U40714) [18], шести последовательностей Tentative Human Consensus (THC) из Human Gene Index (HGI) [19] Института исследований генома (TIGR) и из нуклеотидных последовательностей 58 экспрессируемых последовательностей мРНК человека (EST), депонированных в GenBankTM и dbEST баз данных до мая 1997. Отбор EST и THC осуществляли последовательным поиском гомологичных последовательностей по программе BLAST. Сборку отобранных фрагментов проводили вручную для получения полной консенсусной последовательности кДНК, кодирующей тирозил-тРНК синтетазу человека.

Анализ гомологии аминокислотной последовательности С-концевого домена тирозил-тРНК синтетазы с гомологичными белками. Аминокислотная последовательность С-модуля бычьей тирозил-тРНК синтетазы была выравнена тем же методом с гомологичными доменами других белков: ЕМАР II человека (U10117) [8]; метионил-тРНК синтетазами нематоды *Caenorhabditis elegans* (g1370034) [20], *E. coli* (P00959) [11] и *Methanococcus jannaschii* (Q58659) [21]; Arg1p (кофактор аминоксил-тРНК синтетаз) *Saccharomyces cerevisiae* (P46672) [22]; гипотетическим белком YGJH *E. coli* (P42589); β -субъединицами фенилаланил-тРНК синтетаз *E. coli* (P07395) [12] и *Thermus thermophilus* (P27002) [23]; белком MG449 из *Mycoplasma pneumoniae* (g1673842) [24].

Результаты и обсуждение. Для уточнения нуклеотидной последовательности 3'-концевой части кДНК, кодирующей тирозил-тРНК синтетазу быка, нами были проведены опыты по 3'-RACE. кДНК синтезировали из мРНК печени быка с использованием праймера олиго(dT)-адаптора, при этом собственным праймером в данной реакции служила последовательность (dT)₁₅, а введенная на 5'-конце праймера адапторная последовательность, содержащая несколько сайтов узнавания рестриктаз, предназначалась для дальнейшего проведения

лярного комплекса APCаз (М. Миранд, частное сообщение).

Отдельно В-домен имеет гомологию с некаталитическими С-концевыми доменами в бактериальных метионил-тРНК синтетазах (*E. coli*, 27,7 % и *Th. thermophilus*, 26,7 %) и с некаталитическим доменом В2, локализованным в N-концевой последовательности β -субъединицы бактериальных фенилаланил-тРНК синтетаз (*E. coli*, 26,7 %). Следует отметить, что функциональная роль этого домена как в метионил-тРНК синтетазе *E. coli*, так и для β -субъединиц бактериальных фенилаланил-тРНК синтетаз не установлена. Известно, что С-домен метионил-тРНК синтетазы *E. coli* отщепляется при ограниченном протеолизе и не существен для каталитической активности этого бактериального фермента [25] — аналогично тирозил-тРНК синтетазе млекопитающих. Предполагается его роль в димеризации бактериальной метионил-тРНК синтетазы [25]. Для домена В2 фенилаланил-тРНК синтетазы из *Th. thermophilus* ранее предполагалось участие в связывании антикодона гомологичной тРНК [26], однако это предположение не подтвердилось в последующих прямых исследованиях кристаллического комплекса фенилаланил-тРНК синтетазы с тРНК^{Phe} методом рентгеноструктурного анализа [27]. Интересно отметить, что В-домен имеет гомологию с небольшими бактериальными белками, такими как белок YGJH *E. coli* (41,6 %) и белок MG449 *M. genitalium* (21,9 %), функция которых также неизвестна.

В то же время есть основания предположить, что данный домен участвует во взаимодействии с РНК. Как было показано ранее [6], некаталитический С-домен бычьей тирозил-тРНК синтетазы вносит существенный вклад (не менее 50 %) в сродство синтетазы к высокомолекулярным РНК. Важно отметить также возможную нуклеотидную специфичность связывания этого домена: наибольший эффект ингибирования активности тирозил-тРНК синтетазы в реакции аминокислотирования тРНК оказывал полирибонуклеотид поли(G) [6].

Возможно, что некаталитический С-домен в ходе эволюции был перенесен от других белков биосинтеза белка, предположительно от метионил-тРНК синтетазы или отдельного белка типа Arg1р для придания этому ферменту новых свойств, связанных с его функционированием у высших эукариот. Интересно отметить, что у тирозил-тРНК синтетаз бактерий и низших эукариот (дрожжи) гомологичный домен отсутствует.

Можно предсказать вероятный сайт расщепления нативной формы тирозил-тРНК синтетазы при ее ограниченном протеолизе с образованием функ-

ционально активной формы 2 × 39 кДа. Как видно из рисунка, С-домен тирозил-тРНК синтетазы соединен с каталитическим ядром фермента пептидным участком 340—365. В этом участке возможным сайтом протеолитического расщепления может быть аминокислотная последовательность S₃₅₈EPE. Данная последовательность является PEST-подобной аминокислотной последовательностью, которые, как известно [28], могут быть первичными сайтами для протеолитической атаки внутриклеточными протеазами ряда белков, включая аминокислотил-тРНК синтетазы млекопитающих [29]. Предположение о том, что последовательность S₃₅₈EPE является сайтом протеолитического расщепления в бычьей тирозил-тРНК синтетазе в ходе эндогенного ограниченного протеолиза, требует, естественно, экспериментального подтверждения. Интересно, однако, отметить, что этот предполагаемый сайт расщепления в тирозил-тРНК синтетазе практически совпадает с местом расщепления при образовании зрелого цитокина ЕМАР II из его предшественника: N-концевой остаток D в ЕМАР II [9] соответствует E₃₅₉ в тирозил-тРНК синтетазе (см. рисунок).

На основании полученных данных можно высказать гипотезу о том, что изолированный С-домен вследствие возможного протеолитического расщепления тирозил-тРНК синтетазы внутриклеточной протеазой (предположительно тиоловой) способен также проявлять цитокин-подобную активность.

О. В. Леванець, В. Г. Найденов, К. О. Одиноць, М. І. Вудмаска, Г. Х. Мацука, О. І. Корнелюк

Гомологія С-кінцевого некаталітичного домена тирозил-тРНК синтетази ссавців з цитокином ЕМАР II та некаталітичними доменами метіоніл- і фенілаланіл-тРНК синтетаз

Резюме

Тирозил-тРНК синтетаза ссавців містить С-кінцевий домен, несуттєвий для каталітичної активності ферменту в реакції аміноацилювання гомологічної тРНК^{Phe}. кДНК, яка кодує тирозил-тРНК синтетазу, клонували і секвенували з використанням методу 3'-RACE. Порівняння амінокислотної послідовності С-домена тирозил-тРНК синтетази ссавців з іншими білками по програмі BLASTP показало найвищий рівень гомології (62,7 % ідентичності) з новим цитокином, індукованим при хімічному канцерогенезі, — ЕМАР II, що відповідає білку p43 високомолекулярного комплексу APCаз ссавців, а також з некаталітичними С-доменами метіоніл-тРНК синтетаз нематод (62,7 %) і бактерій (27,7 %) та N-доменом β -субодиниці фенілаланіл-тРНК синтетази *Escherichia coli* (26,7 %). Запропоновано гіпотезу щодо можливого утворення ізольованого С-домена внаслідок протеолітичного розщеплення тирозил-тРНК синтетази внутрішньоклітинними протеазами і проявлення цим доменом цитокин-подібної активності.

O. V. Levaneets, V. G. Naidenov, K. A. Odyneets, M. I. Woodmaska, G. Kh. Matsuka, A. I. Kornelyuk

Homology of C-terminal non-catalytic domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase with cytokine EMAP II and non-catalytic domains of methionyl- and phenylalanyl-tRNA synthetases

Summary

Mammalian tyrosyl-tRNA synthetase contains C-terminal domain which is dispensable for the enzyme catalytic activity in the aminoacylation of homologous tRNA^{tyr}. Cloning and sequencing cDNA which encodes this mammalian tyrosyl-tRNA synthetase was performed by the 3'-RACE method. Comparison of the amino acid sequence of the C-terminal domain of this mammalian tyrosyl-tRNA synthetase with other proteins using program BLASTP has shown the highest homology level (62.7 % identity) with a new cytokine, EMAP II, inducible by chemical cancerogenesis and corresponding to the p43 protein from high molecular weight aaRS complex of mammals and also with non-catalytic C-terminal domains of methionyl-tRNA synthetases from nematode (62.7 %) and bacteria (27.7 %) and with N-terminal domain of the β -subunit of phenylalanyl-tRNA synthetase of *E. coli* (26.7 %). The hypothesis was proposed about possible forming of isolated C-domain as a result of the proteolytic digestion of tyrosyl-tRNA synthetase by intracellular proteases and about possible cytokine-like activity of this C-domain.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes. Structural domains and their implications // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*—1991.—40.—P. 95—142.
- Kisselev L. L., Wolfson A. D. Aminoacyl-tRNA synthetases from higher eukaryotes // *Ibid.*—1994.—48.—P. 86—142.
- Cirakoglu B., Waller J.-P. Do yeast aminoacyl-tRNA synthetases exist as «soluble» enzymes within the cytoplasm? // *Eur. J. Biochem.*—1985.—149.—P. 353—361.
- Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК-синтетаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
- Гнатенко Д. В., Курочкин И. В., Рибкинская Т. А. и др. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК-синтетазы из печени быка // *Укр. биохим. журн.*—1991.—63, № 4.—С. 61—67.
- Курочкин И. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК-синтетазы с высокомолекулярными РНК // *Молекуляр. биология.*—1991.—25, № 3.—С. 779—786.
- Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И. и др. Клонирование кДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, с использованием ПЦР-амплифицированного радиоактивно меченного гибрида зонда // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 2.—С. 121—126.
- Kao J., Ryan J., Brett G. et al. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 20239—20247.
- Kao J., Houck K., Fan Y. et al. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II // *Ibid.*—1994.—269.—P. 25106—25119.
- Tas M. P., Murray J. C. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*—1996.—28.—P. 837—841.
- Dardel F., Fayat G., Blanquet S. Molecular cloning and primary structure of the *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase gene // *J. Bacteriol.*—1984.—160.—P. 1115—1122.
- Mechulam Y., Fayat G., Blanquet S. Sequence of the *Escherichia coli* pheST operon and identification of the himA gene // *Ibid.*—1985.—163.—P. 787—791.
- Frohman M. A., Dush M. K., Martin G. R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1988.—85.—P. 8998—9002.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
- Costa G. L., Grafsky A., Weiner M. P. Cloning and analysis of PCR-generated DNA fragments // *PCR Methods and Applications.*—1994.—3.—P. 338—345.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74.—P. 5463—5467.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.*—1990.—215.—P. 03—410.
- Ribas de Pouplana L., Frugier M., Quinn C. L., Schimmel P. Evidence that two present-day components needed for the genetic code appeared after nucleated cells separated from eubacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 166—170.
- Adams M. D., Kerlavage A. R., Fleischmann R. D. et al. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence // *Nature*—1995.—377 (6547, Suppl.)—P. 3—174.
- Wilson R., Ainscough R., Anderson K. et al. 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans* // *Ibid.*—1994.—368.—P. 32—38.
- Bult C. J., White O., Olsen G. J. et al. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii* // *Science*—1996.—273.—P. 1058—1073.
- Simos G., Segref A., Fasiolo F. et al. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases // *EMBO J.*—1996.—15.—P. 5437—5448.
- Keller B., Kast P., Hennecke H. Cloning and sequence analysis of the phenylalanyl-tRNA synthetase genes (pheST) from *Thermus thermophilus* // *FEBS Lett.*—1992.—301.—P. 83—88.
- Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H. et al. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* // *Nucl. Acids Res.*—1996.—24.—P. 4420—4449.
- Cassio D., Waller J.-P. Modification of methionyl-tRNA synthetase by proteolytic cleavage and properties of the trypsin-modified enzyme // *Eur. J. Biochem.*—1971.—20.—P. 283—300.
- Mosyak L., Reshetnikova L., Goldgur Y. et al. Structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* // *Nature Struct. Biol.*—1995.—2.—P. 537—547.
- Goldgur Y., Mosyak L., Reshetnikova L. et al. The crystal structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{phe} // *Structure.*—1997.—5, N 1.—P. 59—68.
- Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis // *Science.*—1986.—234.—P. 364—368.
- Jacobo-Molina A., Villa-Garcia M., Chen H.-C., Yang D. C. H. Proteolytic signal sequences (PEST) in the mammalian aminoacyl-tRNA synthetase complex // *FEBS Lett.*—1988.—232.—P. 65—68.

Поступила в редакцию 25.11.97