

Моделирование пространственной структуры СООН-концевого цитокин-подобного модуля цитоплазматической тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих

А. Г. Голуб, К. А. Одынец, А. Ю. Ныпорко¹, А. И. Корнелюк

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

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина

*СООН-концевой модуль (С-модуль) цитоплазматических тирозил-тРНК синтетаз хордовых и насекомых гомологичен цитокину ЕМАР II млекопитающих (52,7 % идентичности) и в свободном состоянии обладает сходными биологическими свойствами в экспериментах in vitro. С использованием методов сравнительного моделирования по гомологии создана модель пространственной структуры С-модуля тирозил-тРНК синтетазы быка (*Bos taurus*). Основной частью С-модуля является домен с типом пространственной укладки «OB-fold» (В-домен, остатки Val363-Lys470), содержащий пять β-складок, характерных для этого типа укладки. Подобно ряду «OB-fold»-доменов С-модуль имеет сходство к нуклеиновым кислотам. Сравнение модели С-модуля с антикодон-связывающими «OB-fold»-доменами аспартил- и лизил-тРНК синтетаз позволило предсказать поверхность взаимодействия с РНК и возможные функционально важные аминокислотные остатки. Структурная модель С-модуля является основой для дальнейшего изучения структуры и функций тирозил-тРНК синтетазы, ее взаимодействия с тРНК^{Tyr}, а также цитокин-подобных свойств свободного С-модуля.*

Введение. Цитоплазматическая тирозил-тРНК синтетаза быка (TyrRS, КФ 6.1.1.1) является одной из наиболее изученных аминоксил-тРНК синтетаз (АРСаз) млекопитающих [1]. Основная форма TyrRS быка является гомодимером с M_r $2 \times 59,2$ кДа, каждый мономер которой включает 528 аминокислотных остатков (а. о.) и состоит из двух основных структурных модулей. NH₂-концевой каталитический модуль (около 360 а. о.) соответствует укороченной форме фермента («минимальная» TyrRS, M_r 2×39 кДа) [2] и обладает полной ферментативной активностью в экспериментах *in vitro* [1, 2]. СООН-концевой модуль TyrRS быка (С-модуль, остатки Val363-Ser528)

состоит из 166 а. о. [3] и в настоящее время обнаружен в составе TyrRS других млекопитающих (человек [4], мышь, крыса), рыб (*Danio rerio*) и насекомых (дрозофила). TyrRS беспозвоночных (нематода *Caenorhabditis elegans*), растений, низших эукариот и археобактерий не содержат С-модуля, что свидетельствует о сравнительно позднем его присоединении к TyrRS у общего предка хордовых и насекомых. Мономеры TyrRS эубактерий (прокариот) и митохондрий эукариот также состоят из двух основных модулей, однако в этом случае их СООН-концевые модули имеют размер около 100 а. о. [5] и не гомологичны С-модулю TyrRS хордовых и насекомых. Возможно, что в обоих случаях эти модули выполняют сходные функции, несмотря на их различную структуру и независимое происхождение.

Анализ множественного выравнивания последовательностей, гомологичных С-модулю TyrRS быка, и предсказание их вторичной структуры позволили выделить в составе С-модуля два структурных домена [3]. Основная часть С-модуля представлена доменом с выраженной β -складчатой структурой (В-домен, остатки Val363-Lys470, 108 а. о.), за которым следует содержащий α -спираль(и) субдомен (А-субдомен, остатки Gly471-Ser528, 58 а. о.) [3, 6]. Гомологичные В-домену последовательности присутствуют в белках эукариот, архебактерий и прокариот, А-субдомен обнаружен пока лишь в составе гомологичных С-модулю последовательностей белков эукариот [3].

С-модуль TyrRS быка имеет высокий уровень гомологии (52,7 % идентичности) с цитокином EMAP II (Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II) млекопитающих, который впервые был обнаружен при химически индуцированном канцерогенезе [7]. Цитокин EMAP II активирует эндотелиальные клетки и моноциты, а также проявляет широкий спектр других биологических активностей [8, 9]. Предшественником EMAP II является белок p43 (pro-EMAP II), входящий в состав высокомолекулярного комплекса APCаз высших эукариот [10] и взаимодействующий, в частности, с аргинил-тРНК синтетазой [11].

Было высказано предположение [3] о том, что при протеолитическом расщеплении TyrRS внутриклеточной протеиназой при ее активации может образовываться изолированный С-модуль, способный проявлять цитокин-подобную активность. Гипотеза о цитокин-подобной активности С-модуля была подтверждена в экспериментах *in vitro* [12—14], где было показано, что С-модуль TyrRS индуцирует увеличение хемотаксиса моноцитов и возрастание уровня экспрессии тканевого фактора эндотелиальных клеток человека. Эти эффекты С-модуля близки к таковым, вызываемым EMAP II [12—14].

С-модуль TyrRS также гомологичен COOH-концевым доменам некоторых других белков эукариот (рис. 1), таких как Arc1p (G4p1) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (55,3 % идентичности) [15]; метионил-тРНК синтетазы (MetRS) нематоды *C. elegans* (52,7 %); MetRS риса [16]; ARCE инфузории *Euplotes octocarinatus* [17]; EMAPR морской губки *Geodia cydonium* [18] и др. В случае белков Arc1p (G4p1), p43, ARCE показана роль их COOH-концевых модулей в неспецифическом связывании различных тРНК и их направлении в активные центры ассоциированных с этими белками APCаз [15, 19]. Вероятно, в ходе эволюции С-модуль был независимо перенесен от исходного

белка-предшественника на целый ряд белков, связанных с аппаратом трансляции (таких как TyrRS, MetRS, p43 (pro-EMAP II), Arc1p (G4p1), ARCE, EMAPR) для придания им дополнительных свойств, обусловленных их функционированием у высших эукариот [3].

В-домен С-модуля TyrRS также имеет гомологию с рядом доменов и коротких однодоменных белков прокариот и архебактерий (рис. 1), а именно — с COOH-концевыми доменами MetRS и NH₂-концевыми доменами β -субъединиц фенилаланил-тРНК синтетаз; с короткими (около 110 а. о.) белками YgjH из *E. coli*; CsaA [20] и YtpR из *Bacillus subtilis*; Trbp111 [21] из *Aquifex aeolicus*; MG449 из *Mycoplasma pneumoniae* и др.

Как известно, С-модуль вносит существенный вклад (не менее 50 %) в сродство TyrRS быка к высокомолекулярным РНК [22]. Важно отметить определенную специфичность С-модуля в связывании РНК, поскольку наибольший эффект ингибирования активности TyrRS в реакции аминоацилирования тРНК^{Tyr} вызывал полинуклеотид poly(G) [22]. Кроме того, в экспериментах по химической модификации тРНК^{Tyr} в комплексе с TyrPC также было показано, что С-модуль экранирует нуклеотиды антикодона от модификации нитрозозэтилмочевинной, т. е. антикодон тРНК^{Tyr} относится к области узнавания синтетазой [23].

Таким образом, можно выделить две характерные особенности С-модуля TyrRS, а именно: его структурное и функциональное сходство с цитокином EMAP II, с одной стороны, и с тРНК-связывающими доменами ряда белков — с другой. Несмотря на значительный объем данных о свойствах С-модуля и гомологичных ему доменов, окончательного понимания его роли в составе TyrRS хордовых и насекомых и в свободном состоянии в настоящее время нет. В связи с актуальностью изучения биологических функций цитокин-подобного С-модуля TyrRS в жизнедеятельности клеток и тканей эукариот целью данной работы было моделирование пространственной структуры С-модуля TyrRS быка и анализ свойств полученной модели. Знание структуры С-модуля TyrRS позволит выяснить структурные основы широкого спектра свойств этого и сходных с ним доменов.

Материалы и методы. Гомологичные последовательности находили с использованием различных программ и баз данных сервера BLAST [24] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Последовательности белков взяты из банка данных GenPept сервера NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью сервера Clustal W

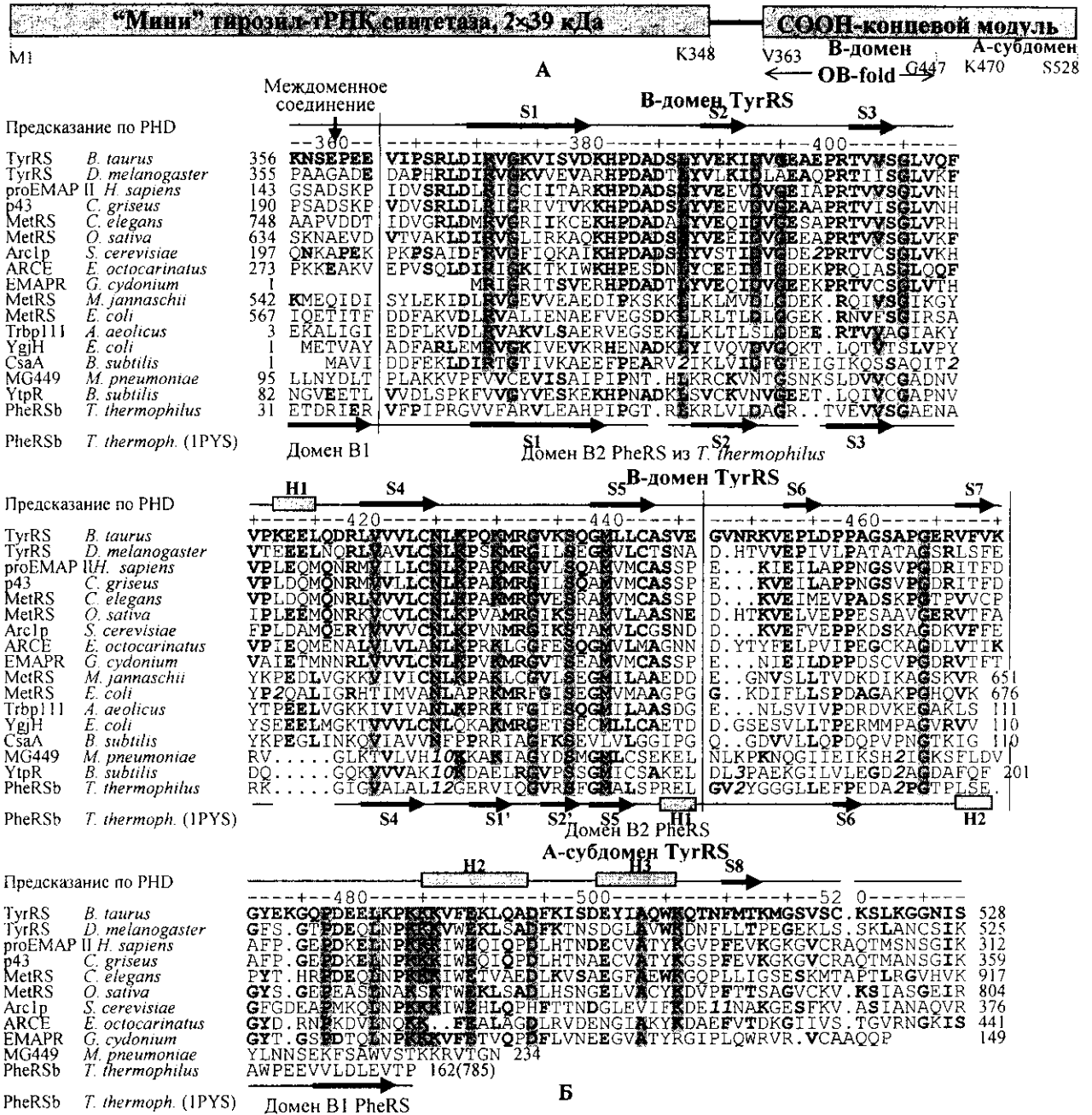


Рис. 1. А — схема строения мономера цитоплазматической TyrRS быка и ее СООН-концевого С-модуля. Указаны границы соответствующих структурных элементов; Б — сравнение аминокислотных последовательностей, гомологичных С-модулю TyrRS быка. Приведены последовательности только типичных представителей отдельных групп белков (всего более 80 гомологичных белков). Нумерация представлена для С-модуля TyrRS быка. Аминокислотные остатки, идентичные последовательности С-модуля TyrRS, выделены серым фоном, а наиболее консервативные остатки — темно-серым. Для участков коротких вставок приведено количество невключенных остатков. Показаны границы В-домена и А-субдомена. Вертикальной стрелкой отмечен вероятный сайт расщепления TyrRS перед началом С-модуля. Элементы вторичной структуры предсказаны для С-модуля TyrRS с помощью программы PHD, а для гомологичного домена В2 фенилаланил-тРНК синтетазы (PheRS) из *T. thermophilus* взяты из структурных файлов 1PYS, 1E1Y, 1B70 и 1B7Y. Приведены последовательности следующих эукариотических белков: TyrRS быка (*B. taurus*) и плодовой мушки (*D. melanogaster*); pro-EMAP II человека (*H. sapiens*); p43 хомяка (*C. griseus*); метионил-тРНК синтетаз (MetRS) нематоды (*C. elegans*) и риса (*O. sativa*); Arc1p (G4p1) дрожжей (*S. cerevisiae*); ARCE инфузории (*E. octocarinatus*); EMAPR морской губки (*G. cydonium*). Белки архебактерий представлены MetRS *M. jannaschii*. Белки прокариот представлены MetRS *E. coli*; однодоменными белками Trbp111 из *A. aeolicus*; YgjH из *E. coli*; CsaA и YtpR из *B. subtilis*; MG449 из *M. pneumoniae*; а также доменом В2 β-субъединицы PheRS *T. thermophilus*. Коды последовательностей приведены для банка данных GenPept (GenBank)

[25] (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). Для предсказания элементов вторичной структуры и экспонированных участков применяли программу PHD [26] (<http://dodo.cpmc.columbia.edu/predictprotein>).

Положение В-домена в системах классификации пространственных структур белковых доменов определяли, используя серверы SCOP (Structure Classification of Proteins), версия 1.48 [27] (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop>) и CATH [28] (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath>). Поиск гомологичных белков с экспериментально определенной структурой, имеющих наиболее высокий уровень гомологии с В-доменом С-модуля TyrRS быка, проводили с помощью сервера VAST (<http://www.ncbi.vastsrv.com>). В связи с отсутствием достаточно гомологичного А-субдомену белка был осуществлен поиск белков с подобной по типу укладки и вторичной структуре по методу «протягивания нити» (threading) с использованием серверов UCLA-DOE [29] (<http://www.fold.doe-mbi.ucla.edu/>) и 3D-PSSM [30] (<http://www.bmm.icnet.uk/~3dpssm/>). Найденные белки использованы в качестве структурных матриц для моделирования пространственной структуры С-модуля. Файлы пространственных координат белков взяты из банка данных PDB (Protein Data Bank) [31] (<http://www.ebi.ac.uk/pdb>).

При построении предварительных моделей и их оптимизации использовали программу для молекулярного моделирования и анализа структур белков HyperChem, версия 5.02 [32, 33] (<http://www.hyper.com>). Для замены аминокислотных остатков и компенсации имеющихся в структуре коротких делеций (четыре делеции) и вставок (по две вставки в В-доме и А-субдоме) применяли функции Mutate и Cut программы HyperChem, а также встроенную базу данных пространственных координат L-аминокислотных остатков.

Лишние остатки в участках делеций удаляли с помощью функции Cut, а затем были восстановлены пептидные связи между COOH- и NH₂-группами крайних аминокислотных остатков. Структурная матрица для моделирования А-субдомена TyrRS (домен белка капсида ВИЧ, PDB-код 1A8O) содержит один модифицированный остаток селенметионина, находящийся в области выравнивания с А-субдомеи TyrRS, замена которого потребовала его предварительной модификации с помощью программы HyperChem. Для исправления некорректной нумерации атомов и аминокислотных остатков, возникшей после компенсации вставок и делеций в полученной неточной модели В-домена TyrRS, использовали модуль Editconf пакета GROMACS,

версия 2.0 (<http://rugmd0.chem.rug.nl/~gmx/gmx.html>).

Промодели оптимизировали по методу молекулярной механики MM+ с помощью программы HyperChem. Оптимизация включала минимизацию потенциальной энергии молекулы, а также величин торсионных углов и длин межатомных связей с учетом электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Использованы следующие параметры: градиент 0,1, максимальное количество циклов (32767), расчет проводили в безводном окружении (в вакууме) с учетом частичных зарядов. Время процесса оптимизации составило около двух суток на компьютере Pentium III 400 МГц. Качество моделей проверяли с помощью модуля Mdrun программного пакета GROMACS в режиме молекулярного рестрейнинга (ограничения) (100 циклов, 2 пс), позволяющего отследить наличие недопустимых параметров молекулы.

Белки-матрицы, промодели и модели анализировали с использованием программ для молекулярного анализа и визуализации молекулярных структур MolMol, версия 2K1 [34] (<http://www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol>) и Swiss-PDB viewer, версия 3.51 [35] (<http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html>). Для визуализации и рендеринга моделей также применяли программу RasMol, версия 2.6 [36] (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol>). Вторичную структуру оптимизированной модели С-модуля определяли с помощью программы DSSP, [37] из пакета GROMACS. Расчет площади поверхности, доступной для растворителя, анализ упаковки полипептидной цепи С-модуля, анализ наличия внутренних полостей и расчет объема С-модуля осуществляли, используя Swiss-PDB viewer и функции Surface, Cavity, Accessibility. Среднеквадратичное отклонение между соответствующими атомами промодели и модели С-модуля рассчитывали в программе MolMol с использованием функции Fit.

Результаты и обсуждение. Поиск и множественное выравнивание гомологичных последовательностей являются важным промежуточным этапом при анализе структуры белков. Поэтому и был повторно проведен поиск гомологичных С-модулю последовательностей цитоплазматической TyrRS быка, появившихся за последние два года (рис. 1). Область гомологии в найденных последовательностях начинается в районе ³⁶³VIPSRLD³⁶⁹ (здесь и далее приведена нумерация по TyrRS быка), которую можно считать началом С-модуля и В-домена [3]. При выравнивании свыше 80 гомологичных последовательностей было обнаружено, что единственным абсолютно консервативным аминокислот-

S6: 452—454; S7: 466—469) и одну α -спираль (H1: 412—415).

По структурной классификации доменов банков данных SCOP и CATH домен B2 PheRS относится к структурному классу «all beta» и имеет пространственную укладку основной цепи типа «OB-fold» (олигонуклеотид-олигосахарид связывающая свертка) [40]. Данный тип укладки характеризуется наличием пяти основных β -складок ($n = 5$), формирующих незамкнутый β -слой ($S = 8$ или 10). Среди «OB-fold»-доменов B2-домен PheRS относится к суперсемейству доменов, связывающих нуклеиновые кислоты, к которому относятся, в частности, антикодонсвязывающие домены аспартил-, лизил- и аспарагинил-тРНК синтетаз. Домен B2 PheRS является в настоящее время единственным представителем семейства «Myf domain» с известной пространственной структурой, и к этому же семейству следует также отнести В-домен С-модуля TyrRS исходя из значительного уровня их гомологии [4]. Другим белком с уже установленной (но еще не опубликованной) пространственной структурой, который также относится к семейству «Myf domain», является небольшой однодоменный белок Trbp111 (111 а. о.) из эубактерий *A. aeolicus* [21] и *T. thermophilus* [41].

Наиболее консервативная часть В-домена ограничена β -складками S1—S5 и представляет собой собственно «OB-fold». В составе В-домена TyrRS β -складки S1—S5 соответствуют пяти основным β -складкам укладки «OB-fold» [40]. Предсказанные программой PHD элементы вторичной структуры имеют соответствующие аналоги в составе белка-матрицы (домен B2 PheRS *T. thermophilus*) (рис. 2), за исключением α -спирали H1, соответствующей короткой вставке в В-домене TyrRS. В структуре домена B2 PheRS имеются две дополнительные короткие β -складки между S4 и S5, обозначенные, как S1' и S2', которые не предсказываются в структуре В-домена TyrRS программой PHD. Однако этот район (Val448-Lys470), входящий в состав В-домена TyrRS, гомологичен домену B2 PheRS и, вероятно, содержит две короткие изолированные β -складки и непосредственно переходит в А-субдомен. Для С-модуля TyrRS характерна вставка ⁴⁴⁸VNR⁴⁵⁰ в В-домене, которая отсутствует в гомологичных последовательностях и может служить отличительным признаком С-модуля в составе TyrRS. Данная вставка расположена сразу после «OB-fold»-домена и отделяет дополнительный элемент из 25 остатков (Val448-Lys470), входящий в состав В-домена.

Вторичная структура А-субдомена, по предсказанию программы PHD, включает две α -спирали и

одну β -складку (рис. 1). Вероятно, А-субдомен относится к классу смешанных ($\alpha + \beta$) доменов. Согласно предсказанию, в А-субдомене имеется протяженная α -спираль H2 (остатки 485—493), в начале которой находится лизин-богатый кластер ⁴⁸²KPKKK⁴⁸⁶. Район А-субдомена, расположенный за спиралью H2, не содержит четко предсказываемых программой PHD элементов вторичной структуры и, вероятно, является менее структурированным. Последовательность ⁴⁸²KPKKK⁴⁸⁶ имеет сходство с классическими сигналами ядерной локализации (NLS) в белках эукариот [42], которые идентифицированы нами также у многих APCаз высших эукариот (неопубликованные результаты).

Для А-субдомена наиболее сходным по вторичной структуре и типу укладки оказался негомологичный СООН-концевой домен белка капсида вируса иммунодефицита человека [43] (остатки Asp152-Pro207, длина 54 а. о., PDB-коды 1A8O и 1AUM). Последовательность этого домена подобна А-субдомону (15 % идентичности, восемь идентичных остатков на участке длиной 50 а. о.) и была выбрана в качестве структурной матрицы для моделирования структуры А-субдомена.

При построении структурной модели С-модуля TyrRS мы применяли методы моделирования по гомологии, основанные на фундаментальном принципе зависимости между уровнем гомологии аминокислотных последовательностей белков и сходством их пространственной структуры [44—46]. Указанные выше белковые домены с установленной структурой были использованы в качестве белков-матриц для независимого моделирования структуры В-домена и А-субдомена и последующего интегрированного моделирования С-модуля. Сопоставление аминокислотных последовательностей С-модуля и структурных матриц, на основе которого осуществляли моделирование, приведено на рис. 2.

С помощью «компьютерного мутагенеза» боковые цепи аминокислотных остатков белков-матриц были заменены боковыми цепями соответствующих им остатков В-домена и А-субдомена (рис. 2) и, таким образом, получены предварительные модели обоих элементов С-модуля, т. е. трехмерные структуры с начальной, не оптимизированной, укладкой полипептидной цепи. Оптимизация геометрии и минимизация свободной энергии предварительной модели В-домена TyrRS потребовала 32767 циклов, в результате чего значение свободной энергии молекулы изменилось от 138745,03 (градиент 427,67) до 337,07 ккал/моль (градиент 0,1). Аналогично при оптимизации промодели А-субдомена параметры процесса составили: начальная энергия молекулы 28907,89 ккал/моль (градиент 297,98); конеч-

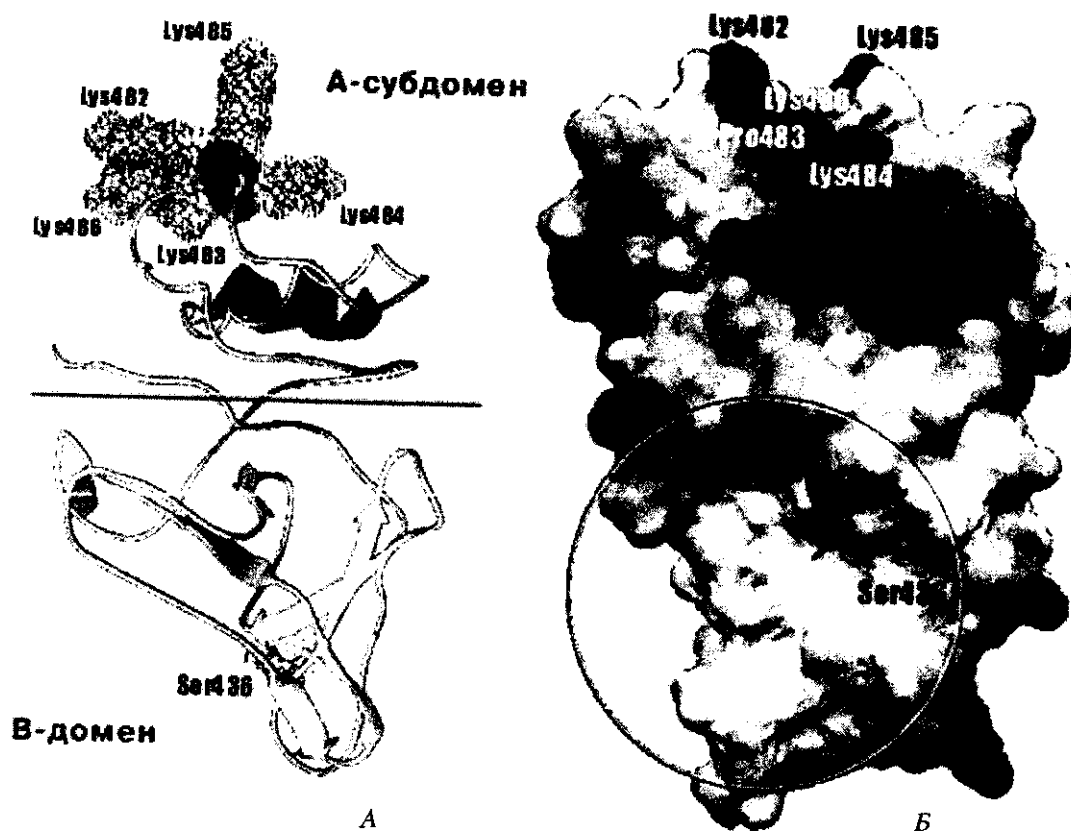


Рис. 3. Модель пространственной структуры СООН-концевого модуля тирозил-тРНК синтетазы быка: А — общая укладка полипептидной цепи и элементы вторичной структуры С-модуля (β -складки и α -спирали). Отмечен лизин-богатый кластер $^{482}\text{KPKKK}^{486}$, расположенный в α -спирали N1 А-субдомена; Б — поверхность модели С-модуля TyrRS по распределению электростатического потенциала. Окружностью выделена гидрофобная впадина, где находится абсолютно консервативный остаток Ser436. Выделен также лизин-богатый кластер $^{482}\text{KPKKK}^{486}$. Изображение получено с помощью программы Swiss-PDB viewer

ная энергия молекулы 116,74 ккал/моль (градиент 0,09).

Полученные модели В-домена и А-субдомена TyrRS представляют собой глобулярные белковые структуры объемом 21953 и 13288 \AA^3 и площадью поверхности 25864 и 7367 \AA^2 , соответственно. Поверхность, доступная для растворителя, составила 16963 и 4951 \AA^2 для В-домена и А-субдомена соответственно. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) в положении соответствующих атомов промодели и модели равно 1,59 \AA для В-домена и 2,33 \AA для — А-субдомена.

Исходя из данных об аминокислотной последовательности С-модуля была создана ковалентная связь (Lys470-Gly471) между последним остатком модели В-домена и первым остатком модели А-субдомена для одновременной оптимизации обоих элементов в полной структуре С-модуля. После прове-

дения максимального (32767) количества циклов оптимизации по методу молекулярной механики MM+ энергия молекулы изменилась от 68584,33 (градиент 2316,03) до 395,59 ккал/моль (градиент 0,09). Проверка качества полученной модели С-модуля с помощью программы GROMACS показала отсутствие каких-либо недопустимых параметров (неразрешенные значения торсионных углов, длин и энергий связей и др.).

Согласно модели (рис. 3), объем всего С-модуля составляет 96349 \AA^3 , а площадь поверхности — 38639 \AA^2 . Поверхность С-модуля, доступная для растворителя, равна 104221 \AA^2 . Среднеквадратичное отклонение (RMSD) между соответствующими атомами предварительной и окончательной моделей С-модуля составило 2,09 \AA . Анализ модели пространственной структуры показал наличие углубления (впадины) на поверхности В-домена, ко-

торая выслана гидрофобными аминокислотными остатками (рис. 3). В районе впадины не выявлено положительно или отрицательно заряженных остатков. Почти в центре этой области расположен абсолютно консервативный остаток Ser436, консервативность которого была обнаружена ранее при множественном выравнивании свыше 80 белковых доменов, гомологичных В-домену TyrRS.

Для многих белковых доменов с типом пространственной укладки «OB-fold», к которым относится В-домен С-модуля TyrRS млекопитающих, характерно свойство связывать нуклеиновые кислоты (суперсемейство белков, связывающих нуклеиновые кислоты по банку данных SCOP). Этот вывод хорошо согласуется с полученными нами ранее данными о РНК-связывающих свойствах С-модуля [22] и об участии С-модуля TyrRS млекопитающих во взаимодействии с антикодоном тРНК^{Tyr} [23].

Сравнительный анализ домена B2 PheRS и NH₂-концевых антикодон-связывающих доменов аспартил-тРНК синтетазы [47] (PDB-коды 1B8A, 1ASZ, 1AZY) и лизил-тРНК синтетазы [48] (PDB-коды 1LYL, 1KRS, 1KRT) из ряда организмов позволил выделить общую поверхность этих «OB-fold»-доменов для взаимодействия с нуклеиновыми кислотами (тРНК) и перенести эту информацию на модель С-модуля TyrRS. Эта поверхность включает α -складки S4 и S5 и соединительную петлю между ними. Консервативный остаток S436, а также консервативные остатки N425, K427, K430, G433 и M439 находятся в данной соединительной петле.

Еще одним возможным сайтом взаимодействия С-модуля с тРНК^{Tyr} является лизин-богатый кластер ⁴⁸²KPKKK⁴⁸⁶, локализованный в α -спирали H1 А-субдомена. Анализ модели С-модуля выявил высокую степень экспонированности остатков лизина этого кластера (рис. 3). Можно предположить, что положительно заряженные остатки лизина могут контактировать с рибозофосфатным остовом тРНК и тем самым блокировать взаимодействие нитрозотилмочевины с фосфатными остатками области антикодона тРНК^{Tyr}, как показано нами ранее [23].

П р и м е ч а н и е. После представления данной работы в печать опубликована статья по определению пространственной структуры гомологичного белка — цитокина ЕМАР II человека методом рентгеноструктурного анализа [49]. Следует отметить значительное сходство полученной модели С-модуля TyrRS и структуры ЕМАР II.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта NATO HTECG.LG 974684.

А. Г. Голуб, К. О. Одынец, О. Ю. Нипорко, О. І. Корнелюк

Моделирование пространственной структуры COOH-концевого цитокин-подобного модуля цитоплазматической тирозил-тРНК синтетазы ссавців

Резюме

COOH-кінцевий модуль (С-модуль) цитоплазматичних тирозил-тРНК синтетаз хордових і комах є гомологічним до цитокину ЕМАР II ссавців (52,7 % ідентичності) і у вільному стані має схожі біологічні властивості в експериментах *in vitro*. З використанням методів порівняльного моделювання за гомологією створено модель просторової структури С-модуля тирозил-тРНК синтетази бика (*Bos taurus*). Головною частиною С-модуля є домен з типом просторового укладання «OB-fold» (В-домен, залишки Val363-Lys470), який вміщує п'ять β -складок, що є характерними для цього типу. Подібно до ряду «OB-fold»-доменів С-модуль має спорідненість до нуклеїнових кислот. Порівняння моделі С-модуля з антикодон-зв'язуючими доменами аспартил- і лизил-тРНК синтетаз дозволило передбачити поверхню взаємодії з РНК і функціонально важливі амінокислотні залишки. Структурна модель С-модуля допоможе подальшому вивченню структури і функцій тирозил-тРНК синтетази, її взаємодії з тРНК^{Tyr}, а також цитокин-подібних властивостей вільного С-модуля.

A. G. Golub, K. A. Odynets, A. Yu. Nyporko, A. I. Konelyuk

Structure modeling of the COOH-terminal cytokine-like module of the mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase

Summary

COOH-terminal module (*C*-module) of cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetases from chordate and insects is homologous to the mammalian cytokine ЕМАР II (52.7 % identity) and in free form has similar biological properties in experiments *in vitro*. The main part of *C*-module is a domain with «OB-fold» type of structure (B-domain, residues Val363-Lys470), containing five β -strands, which are characteristic for this fold type. Like some other «OB-fold»-containing domains *C*-module has affinity to nucleic acids. By using comparative homology modeling methods the *C*-module structure model of bovine (*Bos taurus*) tyrosyl-tRNA synthetase is created. The comparison of *C*-module model with anticodon-binding domains of aspartyl- and lysyl-tRNA synthetases allows to predict the interacting surface with RNA and some functionally important amino acid residues. The *C*-module structure model will help to study further the tyrosyl-tRNA synthetase structure and functions, its interaction with tRNA^{Tyr}, and cytokine-like properties of the free *C*-module.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Корнелюк А. И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 4.—С. 349—359.
2. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Рибкин-ска Т. А., Мацука Г. Х. Выделение и характеристика функционально активной протеолитически модифицированной формы тирозил-тРНК синтетазы из печени быка // Укр. биохим. журн.—1991.—63, № 4.—С. 61—67.
3. Леванец О. В., Найденов В. Г., Одынец К. А., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х., Корнелюк А. И. 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, № 6.—С. 474—478.

4. Kleeman T. A., Wei D., Simpson K. L., First E. A. Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 22.—P. 14420—14425.
5. Bedouelle H. Recognition of tRNA^{Tyr} by tyrosyl-tRNA synthetase // *Biochimie.*—1990.—72, N 8.—P. 589—598.
6. Odynets K. A., Golub A. G., Kornelyuk A. I. 3D structure modeling of COOH-terminal cytokine-like module of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Тез. доп. конф. з генетики та молекуляр. біології, присвяченої 100-річчю генетики.—Львів, 2000.—Т. 1.—С. 138.
7. Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y. G., Godman G., Familletti P. C., Wang F., Pan Y. C., Stern D., Clauss M. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // *J. Biol. Chem.*—1992.—267, N 28.—P. 20239—20247.
8. Kao J., Houck K., Fan Y., Haehnel I., Libutti S. K., Kayton M. L., Grikscheit T., Chabot J., Nowygrad R., Greenberg S., Kuang W.-J., Leung D., Hayward J. R., Kisiel W., Heath M., Brett J., Stern D. M. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial monocyte-activating polypeptide II // *J. Biol. Chem.*—1994.—269, N 40.—P. 25106—25119.
9. Tas M. P., Murray J. C. Endothelial monocyte-activating polypeptide II // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*—1996.—28, N 8.—P. 837—841.
10. Quevillon S., Agou F., Robinson J. C., Mirande M. The p43 component of the mammalian multisynthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 51.—P. 32573—32579.
11. Park S. G., Jung K. H., Lee J. S., Jo Y. J., Motegi H., Kim S., Shiba K. Precursor of pro-apoptotic cytokine modulates aminoacylation activity of tRNA synthetase // *J. Biol. Chem.*—1999.—274, N 24.—P. 16673—16676.
12. Kornelyuk A. I., Tas M. P. R., Dybrovsky A., Murray C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 2.—С. 168—172.
13. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // *Science.*—1999.—284, N 5411.—P. 147—151.
14. Wakasugi K., Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase // *J. Biol. Chem.*—1999.—274, N 33.—P. 23155—23159.
15. Simos G., Sauer A., Fasiolo F., Hurt E. C. A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases // *Mol. Cell.*—1998.—1, N 2.—P. 235—242.
16. Deniziak M., Mirande M., Barciszewski J. Cloning and sequencing of cDNA encoding the rice methionyl-tRNA synthetase // *Acta Biochim. Pol.*—1998.—45, N 3.—P. 669—676.
17. Tan M., Heckmann K., Brunen-Nieweler C. The micronuclear gene encoding a putative aminoacyl-tRNA synthetase cofactor of the ciliate *Euplotes octocarinatus* is interrupted by two sequences that are removed during macronuclear development // *Gene.*—1999.—233, N 1—2.—P. 131—140.
18. Pahler S., Krasko A., Schutze J., Muller I. M., Muller W. E. Isolation and characterization of a cDNA encoding a potential morphogen from the marine sponge *Geodia cydonium* that is conserved in higher metazoans // *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*—1998.—265, N 1394.—P. 421—425.
19. Simos G., Segref A., Fasiolo F., Hellmuth K., Shevchenko A., Mann M., Hurt E. C. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases // *EMBO J.*—1996.—15, N 19.—P. 5437—5448.
20. Muller J. P., Bron S., Venema G., van Dijk J. M. Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis* // *Microbiology.*—2000.—146 (Pt 1).—P. 77—88.
21. Morales A. J., Swairjo M. A., Schimmel P. Structure-specific tRNA-binding protein from the extreme thermophile *Aquifex aeolicus* // *EMBO J.*—1999.—18, N 12.—P. 3475—3483.
22. Курочкин Н. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Взаимодействие эукариотической тирозил-тРНК синтетазы с высокомолекулярными РНК // *Молекуляр. биология.*—1991.—25, № 3.—С. 779—786.
23. Калачнюк Л. Г., Корнелюк О. І., Мацука Г. Х. Тирозинова тРНКQ*?А печінки бика. Визначення ділянок її взаємодії з гомологічною аміноацил-тРНК синтетазою методом хімічної модифікації // *Укр. біохім. журн.*—1995.—67, № 5.—С. 60—65.
24. Zhang J., Madden T. L. PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation // *Genome Res.*—1997.—7, N 6.—P. 649—656.
25. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 22.—P. 4673—4680.
26. Rost B., Sander C., Schneider R. PHD-an automatic mail server for protein secondary structure prediction // *Comput. Appl. Biosci.*—1994.—10, N 1.—P. 53—60.
27. Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures // *J. Mol. Biol.*—1995.—247, N 4.—P. 536—540.
28. Orengo C. A., Martin A. M., Hutchinson G., Jones S., Jones D. T., Michie A. D., Swindells M. B., Thornton J. M. Classifying a protein in the CATH database of domain structures // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*—1998.—54, N 1 (Pt 6).—P. 1155—1167.
29. Elofsson A., Fischer D., Rice D. W., Le Grand S. M., Eisenberg D. A study of combined structure/sequence profiles // *Fold Des.*—1996.—1, N 6.—P. 451—461.
30. Kelley L. A., MacCallum R. M., Sternberg M. J. E. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM // *J. Mol. Biol.*—2000.—299, N 2.—P. 501—522.
31. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The Protein Data Bank // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28, N 1.—P. 235.
32. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling // *Biotechniques.*—1993.—14, N 6.—P. 1010—1013.
33. HyperChem release 5.0. Reference manual.—Ottawa: Hypercube Inc., 1996.—656 p.
34. Koradi R., Billeter M., Wuthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures // *J. Mol. Graph.*—1996.—14, N 1.—P. 51—55.
35. Guex N., Peitsch M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb-Viewer: An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis.*—1997.—18, N 15.—P. 2714—2723.
36. Sayle R. A., Milner-White E. J. RASMOL: biomolecular graphics for all // *Trends Biochem. Sci.*—1995.—20, N 9.—P. 374.
37. Kabsch W., Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features // *Biopolymers.*—1983.—22, N 12.—P. 2577—2637.
38. Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis // *Science.*—1986.—234, N 4774.—P. 364—368.

39. Mosyak L., Reshetnikova L., Goldgur Y., Delarue M., Safran M. G. Structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermophilus thermophilus* // *Nat. Struct. Biol.*—1995.—2, N 7.—P. 537—547.
40. Murzin A. G. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences // *EMBO J.*—1993.—12, N 3.—P. 861—867.
41. Kawaguchi S., Sekine S., Vassilyev D. G., Yokoyama S. Crystal structure of *T. thermophilus* homolog of Trbp111: A novel tRNA binding protein // Abstracts of 18th tRNA Workshop «tRNA 2000» (April 8—12, 2000, Cambridge).—Cambridge: UK., 2000.—P. 5—77.
42. Boulikas T. Nuclear localization signals (NLS) // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.*—1993.—3, N 3.—P. 193—227.
43. Gamble T. R., Yoo S., Vajdos F. F., von Schwedler U. K., Worthylake D. K., Wang H., McCutcheon J. P., Sundquist W. I., Hill C. P. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein // *Science.*—1997.—278, N 5339.—P. 849—853.
44. Hubbard T. J., Lesk A. M. Modeling protein structures // *Computer modeling in molecular biology* / Ed. J. Goodfellow.—Weinheim: VCH, 1995.—P. 10—33.
45. Sanchez R., Badretdinov A. Y., Fcyfant E., Sali A. Homology protein structure modeling // *Cur. Opin. Biotechnol.*—1998.—9, N 4.—P. 383—389.
46. Claessens M., Van Cutsem E., Lasters J., Wodak S. Modelling the polypeptide backbone with «spare parts» from known protein structures // *Protein Eng.*—1989.—2, N 5.—P. 335—345.
47. Schmitt E., Moulinier L., Fujiwara S., Imanaka T., Thierry J.-C., Moras D. Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KGD: archaeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation // *EMBO J.*—1998.—17, N 17.—P. 5227—5237.
48. Onesti S., Miller A. D., Brick P. The crystal structure of lysyl-tRNA synthetase (LysU) from *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.*—1995.—3, N 2.—P. 163—176.
49. Kim Y., Shin J., Li R., Cheong C., Kim K., Kim S. A novel anti-tumor cytokine contains a RNA-binding motif present in aminoacyl-tRNA synthetases // *J. Biol. Chem.*—2000.

УДК 25.12.0025.12.0014:057
Поступила в редакцию 17.08.2000