

Роль нуклеотидов в позициях 1 и 72 акцепторного стебля тРНК^{Tyr} в аминоацилировании 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

Для выяснения вклада каждого из нуклеотидов первой пары акцепторного стебля в тождественность тРНК^{Tyr} быка получены тРНК^{Tyr}-транскрипты, мутантные по позициям 1 и 72. Определены кинетические параметры реакции аминоацилирования мутантных транскриптов рекомбинантной тирозил-тРНК синтетазой из печени быка. Показано, что транскрипт, имеющий первую пару акцепторного стебля G1-G72, характеризуется такой же каталитической эффективностью тирозилирования, как и транскрипт дикого типа с первой парой акцепторного стебля C1-G72. Цитозин в позиции 72 полностью блокирует аминоацилирование транскрипта независимо от того, гуанозин или цитозин находится в первой позиции. Нуклеотидные замены G72A и G72U также снижают акцепторную активность транскрипта, однако в меньшей степени, чем замена G72C. При этом зависимость акцепторной активности транскрипта от нуклеотида в позиции 1 остается слабой. Сделано заключение о том, что вклад первой пары акцепторного стебля в тождественность тРНК^{Tyr} быка связан, главным образом, с гуанозином-72.

Введение. Точность трансляции в значительной степени зависит от специфического аминоацилирования тРНК. Специфичность аминоацилирования, называемая тождественностью тРНК (tRNA identity) [1], определяется наличием в молекуле тРНК структурных элементов, являющихся позитивными сигналами узнавания для родственной аминоацил-тРНК синтетазы. Исследованиями *in vivo* и *in vitro* методами аминоацилирования тирозиновых тРНК из прокариотов [2—7] и дрожжей [8—11], а также миниспиралей тРНК^{Tyr} эукариотического патогена *Pneumocystis carinii* [12] и тРНК^{Tyr}-подобной структуры вируса мозаики костра [13] установлено, что элементами тождественности изученных тирозиновых тРНК являются первая пара акцепторного стебля, дискриминаторный нуклеотид A73 и три нуклеотида антикодона, причем первая пара акцепторного стебля вносит наибольший вклад в тождественность тРНК^{Tyr} архебактерий и дрожжей.

Ранее нами получен *in vitro* транскрипт тРНК^{Tyr} быка и исследованы его акцепторные свойства в реакции аминоацилирования гомологичной тирозил-тРНК синтетазой. [14]. В данной работе для выяснения вклада каждого из нуклеотидов первой пары акцепторного стебля в тождественность тРНК^{Tyr} мы получили ряд мутантных тРНК^{Tyr}-транскриптов и сравнили влияние нуклеотидных замен в позициях 1 и 72 на акцепторные свойства транскриптов.

Материалы и методы. Сайт-направленный мутагенез искусственного гена тРНК^{Tyr} быка. Сайт-направленный мутагенез первой пары акцепторного стебля тРНК^{Tyr} проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием плазмиды *pYU1.3* [14], несущей искусственный ген тРНК^{Tyr} в качестве матрицы, и синтетических праймеров с необходимыми нуклеотидными заменами в позициях, соответствующих позициям 1 или 72 тРНК^{Tyr}.

Продукты ПЦР после очистки препаративным

электрофорезом в 2 %-м агарозном геле клонировали в плазмиду *pUC19* по сайтам рестрикции *EcoRI* и *BamHI*.

Наличие заданных мутаций подтверждали секвенированием обеих цепей рекомбинантных плазмид с использованием набора «T7 Sequenase v.2.0. DNA sequencing Kit» (USB) в соответствии с инструкцией производителя.

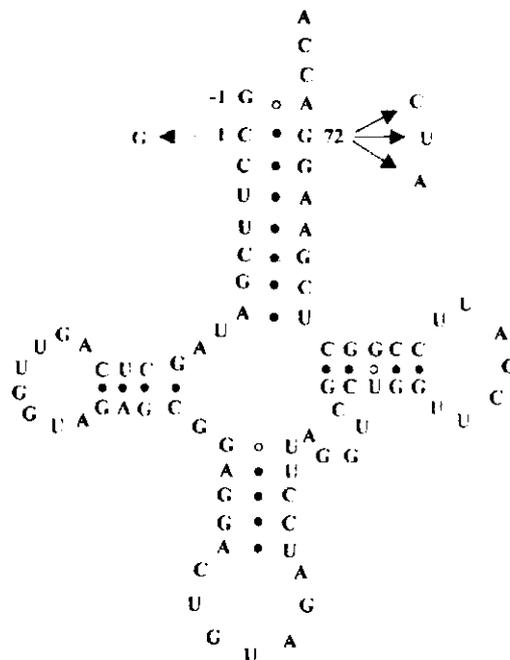
Транскрипция *in vitro*. Плазмиды, несущие мутантные гены тРНК^{Tyr}, линейаризовали рестрикцией *BstNI* в буфере (10 мМ трис-НСl, рН 7,9, 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0,1 мг/мл БСА и 10 ед. акт. *BstNI* на каждый микрограмм плазмиды) в течение 2 ч при температуре 60 °С. Стандартная реакционная смесь для «run-off» транскрипции [15] содержала в объеме 0,5 мл: 40 мМ трис-НСl, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 8 мМ MgCl₂, 2 мМ спермидин, 30 мМ DTT, каждый из четырех рибонуклеозидтрифосфатов в концентрации 1 мМ, 10000 ед./мл Т7 РНК-полимеразы и 0,2 мг/мл линейаризованной плазмиды.

Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, после чего транскрипты очищали препаративным электрофорезом в 15 %-м полиакриламидном геле с 8 М мочевиной. Полноразмерные транскрипты элюировали пятью объемами буфера (10 мМ трис-НСl, рН 7,0, 300 мМ NaCl, 1 мМ EDTA) в течение 16—24 ч при 37 °С. Элюат экстрагировали равным объемом хлороформа и транскрипты пересаждали этанолом.

Бактериальная экспрессия и очистка тирозил-тРНК синтетазы. Бактериальную экспрессию и очистку полноразмерной рекомбинантной тирозил-тРНК синтетазы из печени быка (тирРС) и 39,9-кДа формы фермента, лишенной С-концевого некаталитического домена (тирРС_{ΔC}), осуществляли, как описано ранее [14].

Реакция аминоацилирования. Перед аминоацилированием транскрипты ренатурировали прогреванием при температуре 65 или 80 °С в буфере (30 мМ HEPES-KOH, рН 7,6, 5 мМ MgCl₂) в течение 2 мин и медленным (в течение 30 мин) охлаждением до комнатной температуры.

Реакцию аминоацилирования проводили в буфере, содержащем 30 мМ HEPES-KOH, рН 7,4, 2,5 мМ MgCl₂, 20 мМ KCl, 2 мМ DTT, 2 мМ АТР, 30 мкМ [¹⁴С]-тирозин (13320 МБк/ммоль). Кинетические параметры тирозилирования определяли в присутствии 0,05—3 мкМ тРНК^{Tyr}-транскрипта и 0,03—2,5 мкМ тирозил-тРНК синтетазы при 37 °С. Реакцию останавливали, добавляя 10 объемов охлажденной 7 %-й трихлоруксусной кислоты, фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF-C и измеряли радиоактивность в жидкостном сцинти-



Последовательность транскрипта дикого типа тРНК^{Tyr} быка. Стрелками показаны нуклеотидные замены в позициях 1 и 72 акцепторного стебля

ляционном счетчике «RACK—BETA» («ЛКВ», Швеция). Кинетические константы реакции аминоацилирования определяли из графика Лайнуивера-Берка и/или методом прямых линейных графиков [16]. Представлены средние величины, полученные как минимум из двух независимых экспериментов.

Результаты и обсуждение. Сайт-направленный мутагенез искусственного гена тРНК^{Tyr} быка и получение мутантных транскриптов. Нуклеотидная последовательность тРНК^{Tyr}-транскрипта дикого типа и варианты мутаций в первой паре акцепторного стебля показаны на рисунке.

Для введения нуклеотидных замен в позициях 1 и 72 искусственного гена тРНК^{Tyr} быка методом ПЦР использовали сконструированную нами ранее плазмиду *pBY1.3* [14], несущую искусственный ген тРНК^{Tyr} дикого типа.

Для замены цитозина на гуанозин в позиции 1 искусственного гена тРНК^{Tyr} использовали мутантный праймер:

5'-GAATTCTAATACGACTCACTATAGCTT CGATAGC-3', комплементарный (–) цепи искусственного гена дикого типа в области Т7 промотора и начала структурной части за исключением позиций –1 и +1 тРНК^{Tyr}.

Для введения мутаций в позицию 72 использовали набор мутантных праймеров:

5'-GGATCCTGGT(G,A,T)CTTCCAGCCG-3', комплементарных (+)-цепи искусственного гена дикого типа в 3'-концевой области за исключением замены цитозина в позиции праймера, соответствующей гуанозину-72 в гене дикого типа на гуанозин, аденозин или тимидин.

В паре с мутантными праймерами использовали также универсальные для плазмид серии *pUC* M13 прямой и M13 обратный праймеры. M13 обратный праймер гибридизуется с плазмидой в области полилинкера выше начала искусственного гена, а M13 прямой праймер — в области полилинкера ниже 3'-конца искусственного гена.

При использовании 5'-мутантного праймера в паре с M13 прямым праймером получен вариант искусственного гена тРНК^{Тур} быка с первой парой акцепторного стебля G1-G72. При использовании 5'-мутантного праймера в паре с каждым из 3'-мутантных праймеров получены варианты искусственного гена с первой парой акцепторного стебля — соответственно G1-C72, G1-A72 и G1-T72. Наконец, при использовании 3'-мутантных праймеров в паре с M13 обратным праймером получены варианты искусственного гена с первой парой акцепторного стебля C1-C72, C1-A72 и C1-T72.

Поскольку цитозин в первой позиции искусственного гена неблагоприятен для транскрипции Т7 РНК-полимеразой [17], последние три варианта мутантных генов (как и ген дикого типа) содержали дополнительный 5'-концевой гуанозин.

Акцепторные свойства мутантных транскриптов тРНК^{Тур}. Кинетические параметры реакции аминоацилирования нормального и мутантных транскриптов рекомбинантными тирРС и тирРС_{Δс} быка суммированы в таблице.

Представленные данные показывают, что нуклеотиды первой пары акцепторного стебля являются мажорным элементом тождественности тРНК^{Тур} быка. Замена в транскрипте дикого типа первой пары C1-G72 (характерной для эукариотической тРНК^{Тур}) на G1-C72 (характерную для прокариотической тРНК^{Тур}) полностью подавляет аминоацилирование эукариотическим ферментом. Это согласуется с известными данными, полученными для тРНК^{Тур} из архебактерий, дрожжей и миниспиралей тРНК^{Тур} *P. carinii* [7, 11, 12]. Однако, как следует из таблицы, относительный вклад нуклеотидов первой пары в проявление тождественности различен. Основной вклад вносит нуклеотид в позиции 72. Если в этой позиции находится гуанозин, транскрипт демонстрирует примерно одинаковую акцепторную активность независимо от того, цито-

Кинетические параметры аминоацилирования нормального и мутантных транскриптов тРНК^{Тур} полноразмерными тирРС и тирРС_{Δс} быка

| Вариант первой пары | $k_{cat}, c^{-1} \cdot 10^3$ | КМ, мкМ | $L, \frac{(k_{cat}/K_M)_{wt}}{(k_{cat}/K_M)_{mut}}$ |
|---------------------------|------------------------------|---------|---|
| <i>ТирРС</i> | | | |
| C1-G72 (дикий тип) | 30 | 0,24 | 1,0 |
| G1-G72 | 31 | 0,17 | 0,7 |
| C1-A72 | 4,3 | 0,36 | 10 |
| G1-A72 | 1,8 | 0,33 | 23 |
| C1-U72 | 1,2 | 0,4 | 42 |
| G1-U72 | 0,5 | 0,27 | 69 |
| C1-C72 | н. о. | н. о. | н. о. |
| G1-C72 | н. о. | н. о. | н. о. |
| <i>ТирРС_{Δс}</i> | | | |
| C1-G72 (дикий тип) | 10 | 1,48 | 1,0 |
| G1-G72 | 3 | 0,8 | 1,8 |
| C1-A72 | 0,6 | 2,3 | 26 |
| G1-A72 | 0,28 | 3,1 | 75 |
| C1-U72 | 0,17 | 3,8 | 150 |
| G1-U72 | 0,09 | 4,9 | 380 |
| C1-C72 | н. о. | н. о. | н. о. |
| G1-C72 | н. о. | н. о. | н. о. |

Примечание. *L* — потеря каталитической эффективности мутантными транскриптами выражена как обратная величина их относительной каталитической эффективности по сравнению с транскриптом дикого типа; н. о. — соответствующий параметр не удается определить из-за слишком низкой акцепторной активности данного транскрипта.

зин (как в транскрипте дикого типа) или гуанозин (как в прокариотической тРНК^{Тур}) находится в позиции 1. В то же время, если в позиции 72 находится цитозин, акцепторная активность транскрипта полностью блокируется также вне зависимости от того, гуанозин или цитозин находится в позиции 1.

Аденозин в позиции 72 определяет более высокую акцепторную активность по сравнению с уридином в позиции 72, что видно из сравнения каталитической эффективности аминоацилирования транскриптов с первыми парами акцепторного

стебля C1-A72 и C1-U72, а также G1-A72 и G1-U72. При этом вклад нуклеотида в позиции 1 остается менее выраженным. Например, замена G72 на U72 в транскрипте C1-U72 приводит к 69-кратной потере каталитической эффективности по сравнению с транскриптом дикого типа C1-G72, тогда как разница между транскриптами C1-U72 и G1-U72 незначительна (1,6 раза).

Примечательно, что для проявления акцепторной активности транскриптами тРНК^{Tyr} быка наличие канонической первой пары в их акцепторном стебле необязательно.

В целом для тирРС_{ΔC} наблюдается такая же, как и для полноразмерной тирРС, зависимость каталитической эффективности аминоацилирования от нуклеотидов в позициях 1 и 72 акцепторного стебля транскриптов. В то же время тирРС_{ΔC} проявляет более высокую чувствительность к нуклеотидным заменам в транскриптах. Например, транскрипт с первой парой G1-U72 аминоацилируется полноразмерной тирРС в 69 раз хуже, чем транскрипт дикого типа, в то время как для тирРС_{ΔC} при аминоацилировании тех же транскриптов разница 380-кратная. При этом для тирРС_{ΔC} по сравнению с тирРС становится более заметным снижение сродства мутантных транскриптов к ферменту, что выражается в увеличении вклада K_m в суммарную потерю каталитической эффективности. Это наблюдение согласуется с отмеченной нами ранее способностью некаталитического С-концевого домена тирРС улучшать кинетические характеристики фермента, по-видимому, за счет повышения прочности связывания транскрипта [14].

Таким образом, приведенные выше данные позволяют заключить, что вклад первой пары акцепторного стебля в тождественность тРНК^{Tyr} быка определяется, главным образом, нуклеотидом в позиции 72, тогда как роль нуклеотида в позиции 1 существенно менее выражена.

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

The role of nucleotides in position 1 and 72 of the tRNA^{Tyr} acceptor stem in aminoacylation by bovine tyrosyl-tRNA synthetase

Summary

In order to investigate the contribution of each nucleotide of the first base-pair of bovine tRNA^{Tyr} acceptor stem in tyrosine identity the set of mutant *in vitro* transcripts were prepared. Kinetic parameters of the tyrosylation for each transcript were determined using recombinant bovine tyrosyl-tRNA synthetase overproduced in bacterial system and purified by means of C-terminal 6xHis tag. It was found that transcript with first pair G1-G72 shows nearly the same catalytic efficiency as wild-type transcript C1-G72, whereas C in position 72 completely abolishes tyrosylation regardless of C or G

located in 1st position. A or U in position 72 decrease acceptor activity to a lesser extent, with U72 having the more evident effect, also with weak dependence on nucleotide in 1st position. Basing on this results we suggest that contribution of the first base-pair to bovine tRNA^{Tyr} identity rely mainly on the guanosine in position 72.

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

Роль нуклеотидів у позиціях 1 і 72 акцепторного стебля тРНК^{Tyr} в аміноацилюванні тирозил-тРНК синтетазою печінки бика

Резюме

Для з'ясування внеску кожного з нуклеотидів першої пари акцепторного стебля в тождественность тРНК^{Tyr} бика отримано тРНК^{Tyr}-транскрипти, мутантні по позиціях 1 і 72. Визначено кінетичні параметри реакцій аміноацилювання мутантних транскриптів рекомбінантною тирозил-тРНК синтетазою печінки бика. Показано, що транскрипт з першою парою акцепторного стебля G1-G72 характеризується такою ж каталітичною ефективністю тирозилування, що й транскрипт дикого типу з першою парою акцепторного стебля C1-G72. Цитозин у позиції 72 повністю блокує аміноацилювання транскрипту незалежно від того, гуанозин чи цитозин знаходиться в першій позиції. Нуклеотидні заміни G72A та G72U також знижують акцепторну активність транскрипту, однак у меншій мірі, ніж заміна G72C. При цьому залежність акцепторної активності від нуклеотиду в позиції 1 транскрипта залишається слабкою. Зроблено висновок, що внесок першої пари акцепторного стебля в тождественность тРНК^{Tyr} бика пов'язаний, головним чином, з гуанозином-72.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McClain W. Rules that govern tRNA identity in protein synthesis // J. Mol. Biol.—1993.—234.—P. 257—280.
2. Hou Y. M., Schimmel P. Modeling with *in vitro* kinetic parameters for the elaboration of transfer RNA identity *in vivo* // Biochemistry.—1989.—28, N 12.—P. 4942—4947.
3. Bedouelle H. Recognition of tRNA^{Tyr} by tyrosyl-tRNA synthetase // Biochimie.—1990.—72, N 8.—P. 589—98.
4. Sherman J. M., Rogers K., Rogers M. J., Soll D. Synthetase competition and tRNA context determine the *in vivo* identity of tRNA discriminator mutants // J. Mol. Biol.—1992.—228.—P. 1055—1062.
5. Bedouelle H., Guez-Ivanier V., Nageotte R. Discrimination between transfer-RNAs by tyrosyl-tRNA synthetase // Biochimie.—1993.—75.—N 12.—P. 1099—1108.
6. Himeno H., Hasegawa T., Ueda T., Watanabe K., Shimizu M. Conversion of aminoacylation specificity from tRNA^{Tyr} to tRNA^{Ser} *in vitro* // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 6815—6819.
7. Fechter P., Rudinger-Thirion J., Tukalo M., Giege R. Major tyrosine identity determinants in *Methanococcus jannaschii* and *Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{Tyr} are conserved but expressed differently // Eur. J. Biochem.—2001.—268.—P. 761—767.
8. Bare L. A., Uhlenbeck O. C. Specific substitution into the anticodon loop of yeast tyrosine transfer RNA // Biochemistry.—1986.—25.—P. 5825—5830.
9. Lee C. P., RajBhandary U. L. Mutants of *Escherichia coli* initiator tRNA that suppress amber codons in *Saccharomyces cerevisiae* and are aminoacylated with tyrosine by yeast extracts // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 11378—11382.
10. Chow C. M., RajBhandary U. L. *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase gene. Isolation by com-

- plementation of a mutant *Escherichia coli* suppressor tRNA defective in aminoacylation and sequence analysis // *J. Biol. Chem.*—1993.—268.—P. 12855—12863.
11. *Fechter P., Rudinger-Thirion J., Theobald-Dietrich A., Giege R.* Identity of tRNA for yeast tyrosyl-tRNA synthetase: tyrosylation is more sensitive to identity nucleotides than to structural features // *Biochemistry.*—2000.—39.—P. 1725—1733.
 12. *Quinn C. L., Tao N., Schimmel P.* Species-specific microhelix aminoacylation by a eukaryotic pathogen tRNA synthetase dependent on a single base pair // *Biochemistry.*—1995.—34.—P. 12489—12495.
 13. *Fechter P., Giege R., Rudinger-Thirion J.* Specific tyrosylation of the bulky tRNA-like structure of bromo mosaic virus RNA relies solely on identity nucleotides present in its amino acid-accepting domain // *J. Mol. Biol.*—2001.—309.—P. 387—399.
 14. *Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х.* Кинетические параметры аминоацилирования тРНК^{Tyr} транскрипта тирозил-тРНК синтетазой из печени быка // *Биополимеры и клетка.*—2001.—17, № 6.—С. 534—539.
 15. *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.
 16. *Eisenthal R., Cornish-Bowden A.* The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. // *Biochem. J.*—1974.—139, N 3.—P. 715—20.
 17. *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 04.06.01