

Сайт-направленный мутагенез остатков лизина, локализованных в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена (свертки Россмана) тирозил-тРНК синтетазы из печени быка

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

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

Методом сайт-направленного мутагенеза изучена функциональная роль аминокислотных остатков лизина 146 и 147, локализованных в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена эукариотической тирозил-тРНК синтетазы. Обнаружено, что замена как обоих положительно заряженных остатков лизина на аспарагин и тирозин соответственно, так и одного остатка лизина-147 приводит к полной инактивации фермента в реакции аминокислотирования гомологичной тРНК^{Tyr} быка. Сделано предположение о возможной роли данного остатка лизина в стабилизации переходного состояния при взаимодействии синтетазы с акцепторным стеблем гомологичной тРНК^{Tyr}.

Введение. В процессе биосинтеза белка аминокислот-тРНК синтетазы (АРСаза, КФ 6.1.1) осуществляют активацию аминокислот за счет энергии АТФ и их перенос на тРНК. При этом реализуется узнавание тРНК гомологичными АРСазами, являющееся примером высокоспецифического белково-нуклеинового взаимодействия [1]. Основным методом, позволяющим детально описать молекулярный механизм узнавания тРНК синтетазами и роль отдельных аминокислотных остатков как в узнавании субстратов, в том числе тРНК, так и в катализе реакции аминокислотирования, является рентгеноструктурный анализ кристаллов [2, 3]. В то же время следует отметить отсутствие рентгеноструктурных данных для АРСаз высших организмов, в первую очередь млекопитающих, включая человека.

Альтернативным подходом для изучения структурно-функциональных взаимодействий в АРСазах являются методы селективных химических мо-

дификаций и сайт-направленного мутагенеза, позволяющие изучить функциональную роль определенных аминокислотных остатков в белках.

Тирозил-тРНК синтетаза (ТирРС) из печени быка (КФ 6.1.1.1, димер 2 × 59 кДа) состоит из двух функциональных модулей: N-концевого каталитического ядра (39 кДа), содержащего нуклеотидсвязывающий домен, свертку Россмана, и некаталитического C-домена [4–6].

Проблема строения активного центра и механизма узнавания эукариотической тРНК^{Tyr} тирозил-тРНК синтетазой является весьма важной, поскольку первая содержит короткую дополнительную петлю в отличие от длинопетлевых прокариотических тРНК^{Tyr} и не аминокислотирована бактериальным ферментом, т. е. отсутствует перекрестное аминокислотирование [7]. Ранее с помощью методов селективных химических модификаций нами изучена структура активного центра эукариотической ТирРС. На основании полученных данных сделан вывод о существенной роли остатков гистидина [8], цистеина и лизина [9–11].

© В. Г. НАЙДЕНОВ, М. И. ВУДМАСКА, А. И. КОРНЕЛЮК,
Г. Х. МАЦУКА, 2000.

Изучение химической модификации остатков лизина ТирРС из печени быка пиридоксаль-5'-фосфатом [10, 11] показало, что модификации подвергаются два остатка лизина на субъединицу фермента, причем тРНК эффективно защищает фермент от модификации. В то же время критическим для активности является только один остаток лизина, модификация которого приводит к 80 %-й инактивации фермента в реакции аминокцилирования гомологичной тРНК^{Tyr}.

С другой стороны, недавно было показано [12], что для активности ТирРС человека существенным элементом структуры является соединительный пептид нуклеотидсвязывающего домена, называемого сверткой Россмана. Так как первичные структуры ТирРС быка [5, 6] и человека [13] высокогомологичны (на 96 %), мы предположили идентичность механизмов узнавания гомологичных тРНК этими ферментами. Анализ первичной структуры ТирРС быка (AF087021) в области соединительного пептида свертки Россмана (аминокислотные остатки 127—162) показал наличие кластера остатков лизина K146K147, который является наиболее вероятным кандидатом для функционально важного остатка лизина. Для проверки этой гипотезы в данной работе нами были проведены замены аминокислотных остатков лизина-146 и 147 на остатки аспарагина и тирозина соответственно.

Материалы и методы. Сайт-направленный мутагенез ТирРС по остаткам лизина-146 и 147 осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) методом «мегапраймера» [14]. Фрагмент клона *pY4018* (плазмида *pGEX-2T*, экспрессирующая 39-кДа форму ТирРС из печени быка, слитую с глутатион-S-трансферазой; конструирование *pY4018* будет подробно описано дополнительно) от сайта *XbaI* (267) до сайта *SacI* (669)

был клонирован в плазмиду *pBluescript SK(+)* по тем же сайтам.

Реакционная смесь для первого раунда ПЦР содержала в объеме 100 мкл: 20 мМ трис-НСI (рН 8,5), 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCl₂, четыре дезоксинуклеозидтрифосфата в концентрации 0,2 мМ каждый, 0,1 %-й тритон X-100, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 100 нг плазмиды, мутантный праймер и праймер m13 reverse в концентрации 0,5 мкМ каждый, а также 5 ед. акт. *Pfu*-полимеразы. По завершении 30 циклов ПЦР в режиме: 94 °С — 1 мин; 55 °С — 1 мин; 72 °С — 2 мин продукт ПЦР длиной 310 нуклеотидных пар был очищен препаративным электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле и использован в качестве мегапраймера во втором раунде ПЦР в паре с праймером m13 forward.

Реакционная смесь для второго раунда ПЦР имела такой же состав, что и в первом раунде, за исключением того, что количество плазмиды было увеличено до 1 мкг. Продукт второго раунда ПЦР длиной 597 нуклеотидных пар после очистки препаративным электрофорезом был обработан рестриктазами *SacI* и *XbaI* и лигирован в плазмиду *pY4018*. Наличие ожидаемых нуклеотидных замен подтверждено секвенированием обеих цепей мутантной плазмиды.

Бактериальная экспрессия и очистка мутантных белков и белка дикого типа. Для экспрессии ТирРС дикого типа и мутантных белков были использованы клетки *Escherichia coli* штамма BL21 (*E. coli* В F⁻ dcm ompT hsdS (rb⁻ mb⁻) gal). Индукцию, культивирование клеток, а также очистку экспрессированных белков осуществляли в соответствии с методиками, описанными в [15].

Аминокцилирование тРНК белком дикого типа и мутантными белками. Стандартная реакци-

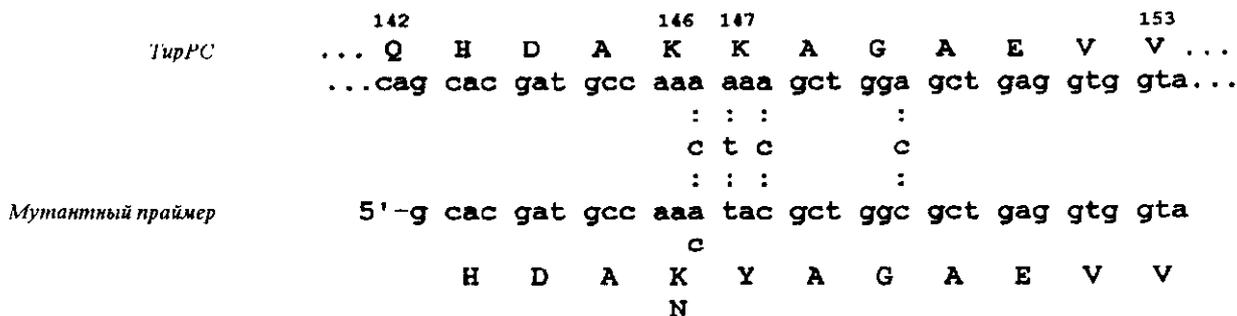


Рис. 1. Фрагмент последовательности тирозил-тРНК синтетазы быка в области соединительного пептида свертки Россмана и последовательность праймера для сайт-направленного мутагенеза

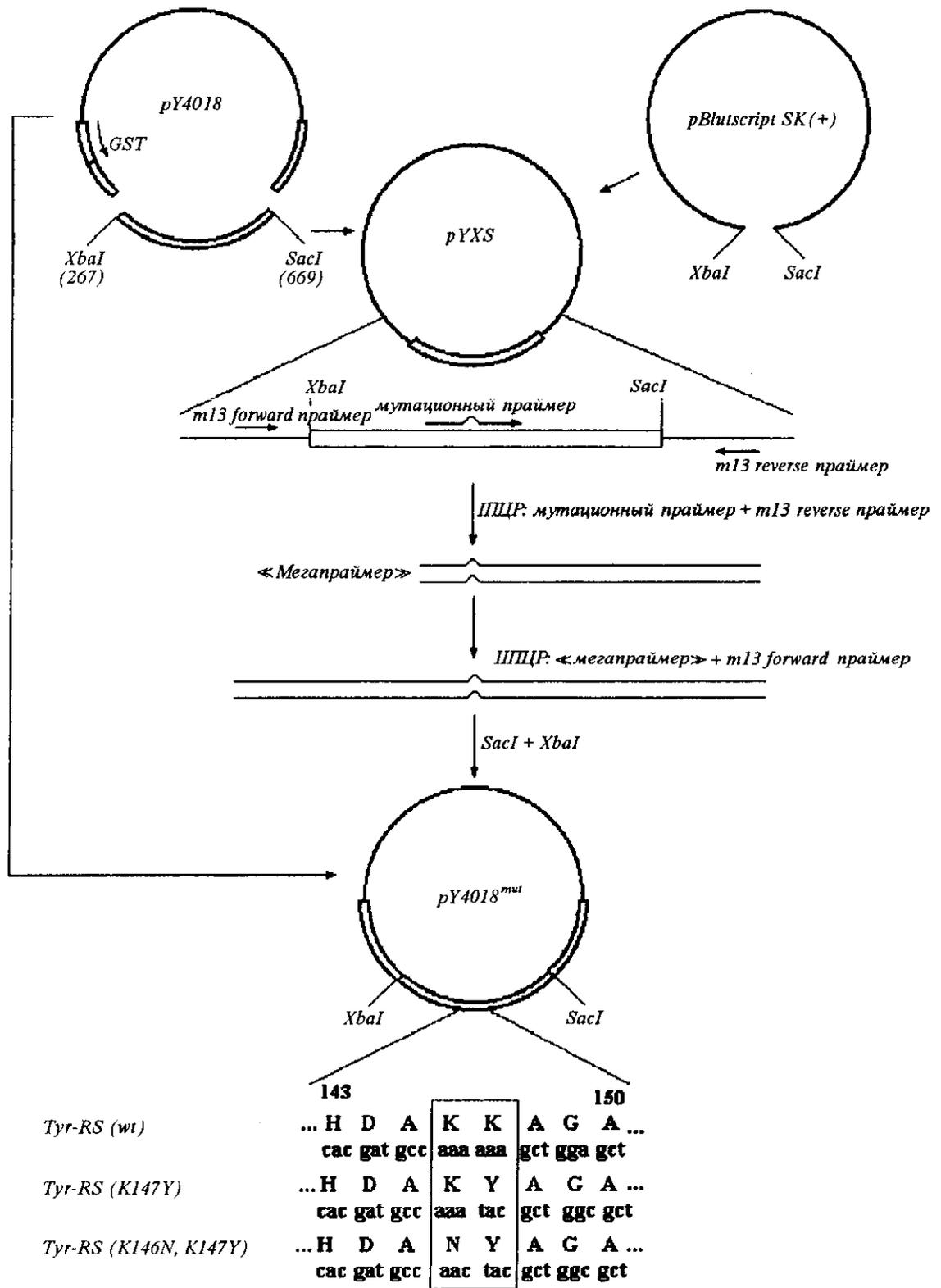


Рис. 2. Общая схема сайт-направленного мутагенеза и клонирования мутантной тирозил-тРНК синтетазы

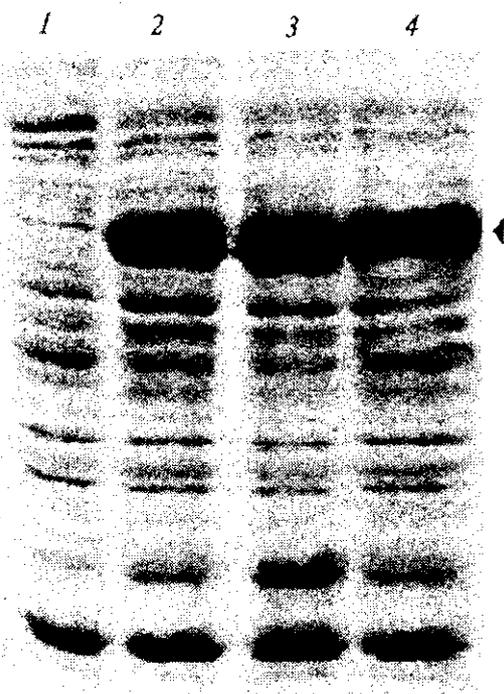


Рис. 3. Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия бактериальной экспрессии нормальной и мутантной тирозил-тРНК синтетазы быка: 1, 2 — лизаты клеток, несущих плазмиду с геном синтетазы дикого типа; 3, 4 — лизаты клеток, несущих плазмиды с генами синтетазы K147Y и K146N, K147Y соответственно (1 — в отсутствие ИПТГ; 2—4 — после индукции ИПТГ)

онная смесь для аминоацилирования содержала в объеме 20—50 мкл: 30 мМ HEPES-KOH (pH 7,6), 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТР (pH 7,0), 2 мМ DTT, 10—20 мкМ [¹⁴C]тирозин (удельная активность 1332 ПБк/моль; 0,1—1 мкМ дрожжевая тРНК^{Tyr}. Последним в реакцию смесь вносили препарат ТирРС до конечной концентрации 0,1—0,5 мкМ и проводили инкубацию при 25 °С. Реакцию останавливали добавлением 10 объемов охлажденного 7 %-го раствора трихлоруксусной кислоты, фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF-C и измеряли радиоактивность в толуольном сцинтиляторе на счетчике «РАСК-ВЕТА».

Результаты и обсуждение. Аминокислотные замены в соединительном пептиде ТирРС вводили с использованием ПЦР и мутантного праймера (рис. 1), комплементарного (–)-цепи ДНК гена

ТирРС в области Gln 142-Val 153 (за исключением указанных на рис. 1 замен). Использовали синтетический мутантный праймер, содержащий четыре нуклеотидные замены в позициях 13, 14, 16 и 22. Замены в позициях праймера 14 и 16 (А-Т и А-С соответственно) приводят к замене в белке остатка лизина-147 на тирозин. Нуклеотидная замена в позиции 13 праймера (А-С) приводит к замене лизина-146 на аспарагин. Следует отметить, что мутантный праймер вырожден в положении нуклеотида 13, что позволило получить в конечном итоге два варианта мутаций в ТирРС: одинарную — K147Y и двойную — K146N, K147Y.

Нуклеотидная замена А-С в позиции 22 мутантного праймера является «молчащей», т. е. не приводит к аминокислотной замене в последовательности кодируемого белка. Ее ввели, чтобы получить сайт рестрикции для рестриктазы *HaeII*, наличие которого позволило проводить скрининг и отбор мутантных клонов.

Схема получения методом ПЦР мутантных фрагментов ДНК и клонирования мутантной ТирРС в бактериальном экспрессирующем векторе *pGEX* представлена на рис. 2.

Фрагмент клона *pY4018* от сайта *XbaI* (267) до сайта *SacI* (669) был клонирован в плазмиду *pBluescript SK(+)* по тем же сайтам.

С использованием мутантного праймера и праймера m13 reverse (место посадки которого имеется в плазмиде *pBluescript SK(+)* выше сайта *XbaI*) методом ПЦР была получена 3'-концевая часть *XbaI-SacI*-фрагмента гена ТирРС, несущая заданные мутации. Этот ПЦР-фрагмент использо-

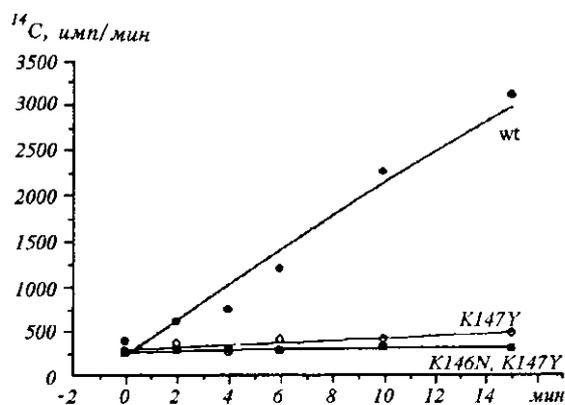


Рис. 4. Кинетика аминоацилирования дрожжевой тРНК очищенными нормальной (wt) и мутантной (K147Y; K146N, K147Y) тирозил-тРНК синтетазой

ван в качестве «мегапраймера» в паре с праймером m13 forward для получения 5'-концевой части *XbaI-SacI*-фрагмента. Следует отметить, что для ПЦР использовали *Pfu*-полимеразу, отличающуюся повышенной точностью синтеза ДНК, чтобы свести к минимуму возможные нежелательные и случайные мутации.

Мутантный *XbaI-SacI*-фрагмент был клонирован в плазмиду *pBluescript SK(+)*. Затем проводили секвенирование для подтверждения наличия заданных мутаций, после чего мутантный *XbaI-SacI*-фрагмент возвращали в плазмиду *pY4018*.

Бактериальную экспрессию исходного и мутантных белков осуществляли в клетках *E. coli* штамма BL-21 (рис. 3).

После разрушения клеток ультразвуком нормальный и мутантные белки очищали аффинной хроматографией на колонке с глутатион-сефарозой и тестировали в системе *in vitro* по способности аминоацилировать дрожжевую тРНК (рис. 4).

Обнаружено, что замена двух остатков лизина — 146 и 147 и даже одного 147 приводит к практически полной потере ферментативной активности синтетазы в реакции аминоацилирования эукариотической тирозин-специфичной тРНК.

Таким образом, методами белковой инженерии впервые показано, что критическим остатком лизина в реакции аминоацилирования тРНК эукариотической ТирРС является остаток Lys147, локализованный в соединительном пептиде нуклеотидсвязывающего домена синтетазы. Данный соединительный пептид (127—162) является вставочным и соединяет две половины свертки Россмана — нуклеотидсвязывающего домена, присутствующего во всех АРСазах 1-го структурного класса.

Данный остаток лизина 147 является одним из наиболее интересных структурных элементов тРНК-связывающего центра бычьей ТирРС, так как, очевидно, он соответствует функционально важному остатку лизина, обнаруженному нами ранее [10, 11] в экспериментах по модификации синтетазы селективным реагентом пиридоксаль-5'-фосфатом. При модификации этого единственного остатка лизина, с одной стороны, почти полностью ингибировалась активность фермента, а с другой — проявлялась антикооперативность взаимодействия двух субъединиц синтетазы [10, 11]. Этот остаток, вероятно, соответствует остатку лизина в ТирРС из *Bacillus stearothermophilus*, участвующему в формировании дополнительного контакта с тРНК^{Tyr} (аденином-73) в переходном состоянии и являющемуся критическим для узнавания тРНК^{Tyr} среди других тРНК *B. stearothermophilus* [16, 17].

В. Г. Найденов, М. I Вудмаска, О. I. Корнелюк, Г. X. Мацука

Сайт-спрямований мутагенез залишків лізину, локалізованих у з'єднувальному пептиді нуклеотидзв'язуючого домену (згортки Россмана) тирозил-тРНК синтетазі з печінки бика

Резюме

Методом сайт-спрямованого мутагенезу вивчено функціональну роль амінокислотних залишків лізину-146 та 147, локалізованих у з'єднувальному пептиді нуклеотидзв'язуючого домену (згортки Россмана) еукариотичної тирозил-тРНК синтетазі. Встановлено, що заміна як обох позитивно заряджених залишків лізину на аспарагін та тирозин відповідно, так і одного залишку лізину-147 призводить до повної інактивації синтетазі в реакції аміноацлювання гомологічної тРНК^{Tyr}. Зроблено висновок щодо можливої ролі даного залишку лізину в стабілізації перехідного стану при взаємодії синтетазі з акцепторним стеблом гомологічної тРНК^{Tyr}.

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

Site-directed mutagenesis of lysine residues located in the connection peptide of the nucleotide-binding domain (Rossman fold) of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver

Summary

The functional role of lysine 146 and 147 residues located in the connection peptide of the nucleotide-binding domain (Rossman fold) of eukaryotic tyrosyl-tRNA synthetase has been studied by means of site-directed mutagenesis. Replacement of both positively charged residues with asparagine and tyrosine correspondingly as well as substitution of lysine 147 alone cause inactivating of tyrosyl-tRNA synthetase in the reaction of aminoacylation of homologous tRNA. The significance of lysine 147 in stabilization of complex between synthetase and tRNA acceptor stem has been suggested.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs // *Ann. Rev. Biochem.*—1987.—56.—P. 125—158.
2. Arnez J., Moras D. Structural and functional consideration of the aminoacylation reaction // *TIBS.*—1997.—22.—P. 211—216.
3. Cusack S., Berthet-Colominas C., Hartlein M., Nassar N., Leberman R. A second class of synthetases structure revealed by X-rays analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å // *Nature.*—1990.—347.—P. 249—255.
4. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. X. Тирозил-тРНК синтетазы из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // *Молекуляр. биология.*—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
5. Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Мацука Г. X., Корнелюк А. И. Клонирование «ДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, с использованием ПЦР-амплифицированного радиоактивно меченного гибридного зонда // *Биополимеры и клетка.*—1997.—13, № 2.—С. 121—126.
6. Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Мацука Г. X., Корнелюк А. И. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента «ДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, № 5.—С. 66—70.
7. Курочкин И. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. X. Взаимо-

- действие эукариотической тирозил-тРНК-синтетазы с высокомолекулярными РНК // Молекуляр. биология.—1991.—25, № 3.—С. 779—785.
8. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК-синтетаза из печени быка. Изучение функциональной роли остатков гистидина // Биоорг. химия.—1991.—17, № 8.—С. 1033—1037.
 9. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Изучение функциональной роли остатков лизина тирозил-тРНК синтетазы из печени быка методом химической модификации о-фталевым альдегидом // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1991.—№ 5.—С. 140—143.
 10. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Лаврик О. И. Химическая модификация остатков лизина тирозил-тРНК синтетазы из печени быка с помощью пиридоксаль-5'-фосфата // Биохимия.—1991.—56, № 11.—С. 56—60.
 11. Gnatenko D. V., Kornelyuk A. I., Matsuka G. Kh. One lysine residue of tyrosyl-tRNA synthetase from bovine liver is critical for aminoacylation of tRNA^{Tyr} // Abstracts of 21th FEBS Meeting, Suppl. Abstracts.—Dublin, 1992.—Tu-180.
 12. Wakasugi K., Quinn C., Tao N., Schimmel P. Genetic code in evolution: switching species-specific aminoacylation with a peptide transplant // EMBO J.—1998.—17.—P. 297—305.
 13. 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.—1999.—272, N 22.—P. 14420—14425.
 14. Barik S. Mutagenesis and gene fusion by megaprimer PCR // Methods in Molecular Biology. PCR Cloning Protocols / Ed. B. A. White.—New York: Humana press, 1997.—V. 6.—P. 173—182.
 15. GST Gene Fusion System. Third Edition.—New York: Pharmacia Biotech, 1997.
 16. Beduelle H. Recognition of tRNA^{Tyr} by tyrosyl-tRNA synthetase // Biochimie.—1990.—72.—P. 589—598.
 17. Ferst A. R., 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.

УДК 577.152.611:576.31
Поступила в редакцию 29.12.99