

Предполагаемый активный центр редактирующего домена пролил-тРНК синтетазы бактерии *Enterococcus faecalis*

К. С. Бояршин, И. А. Крикливый, А. В. Раевский, А. А. Химин,
А. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

kboyarshin@mail.ru

*Обеспечение аминокислотной специфичности аминоацил-тРНК синтетаз в ряде случаев требует проведения гидролиза ошибочно синтезированных продуктов, известного как аминокислотное редактирование. Бактериальные пролил-тРНК синтетазы содержат специальный редактирующий домен, деацилирующий аланил-тРНК^{Pro} и таким образом демонстрирующий посттрансферную редактирующую активность. Механизм тРНК-зависимого редактирования пролил-тРНК синтетазой остается нераскрытым. Цель настоящей работы состояла в изучении структуры активного центра редактирующего домена пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis*. Аминокислотные позиции E218, T257, K279, G331, S332, G334, H366 избраны для сайт-направленного мутагенеза (аланинового сканирования), а редактирующая активность мутантных форм сопоставлена с диким типом пролил-тРНК синтетазы. Выявлены три аминокислотных остатка, имеющих значение для посттрансферной редактирующей активности фермента, – K279, G331 и H366. Полученные данные подтверждают существующие предположения о структуре активного центра редактирующего домена бактериальных пролил-тРНК синтетаз.*

Ключевые слова: пролил-тРНК синтетаза, редактирование, тРНК, сайт-направленный мутагенез.

Введение. Для обеспечения аминокислотной специфичности ряда аминоацил-тРНК синтетаз необходимо не только специфическое узнавание аминокислоты, но и гидролиз ошибочно синтезированных продуктов, называемый редактированием. Редактирование может происходить двумя различными способами – гидролиз ошибочно синтезированного аминоациладенилата (претрансферное редактирование) и гидролиз ошибочно синтезированной аминоацил-тРНК (посттрансферное редактирование) [1].

В настоящее время механизмы посттрансферного редактирования аминоацил-тРНК синтетазы первого структурного класса достаточно хорошо исследованы [2–4]. Продолжается изучение аналогичных механизмов у аминоацил-тРНК синтетаз второго структурного класса на фенилаланил- [5] и треонил-тРНК синтетазах [6]. При этом посттрансферное редактирование пролил-тРНК синтетазами остается изученным сравнительно недостаточно.

Проліл-тРНК синтетази бактеріального типу обладати здатністю пре- і посттрансферного редагування аланіна [7], причеи останнє

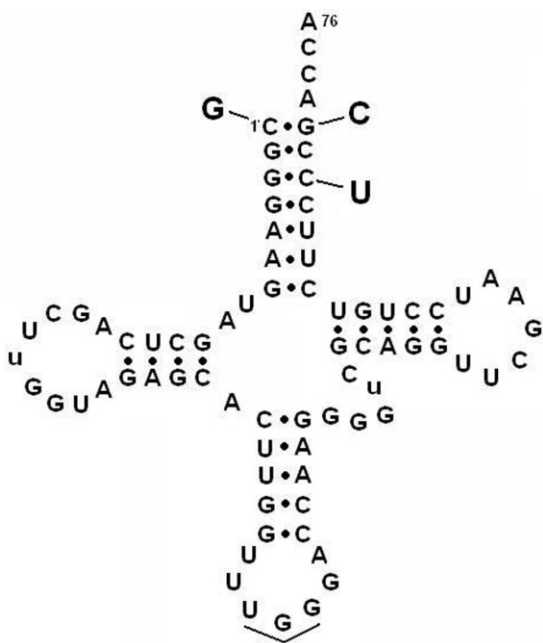


Рис. 1. Мутантная тРНК^{Pro} *E. faecalis* (тРНК^{ProAla}), в последовательность которой введены элементы узнавания для аланил-тРНК синтетазы. Подчеркнуты нуклеотиды антикодона

протекает в специализированном редактирующем домене, получившем в литературе название INS (insertion) [8, 9]. На сегодняшний день как результаты сайт-направленного мутагенеза (на ферменте из *Escherichia coli*) [10], так и структурные данные (на ферменте из *E. faecalis*) [11] позволили выдвинуть ряд предположений о дислокации и структуре активного деацилирующего сайта редактирующего домена пролил-тРНК синтетаз бактериального типа. Для фермента *E. coli* показано специфическое значение консервативного лизина K279 и консервативного гистидина H369 для эффективности и специфичности посттрансферного редактирования и сделано предположение об их участии в формировании деацилирующего активного сайта [10]. На основании структурных данных подчеркивалась возможная роль консервативных лизина K279, глицина G331 и гистидина H366 как структурных и функциональных элементов деацилирующего активного сайта фермента *E. faecalis* [11]. Целью данной работы является проверка этих предположений, а также степени сходства механизмов посттрансферного редактирования у ферментов из филогенетически удаленных бактерий *E. faecalis* (тип *Firmicutes*) и *E. coli* (тип *Proteobacteria*).

Материалы и методы. В работе использовали набор для мутагенеза фирмы «Stratagene» (США), набор для выделения плазмидной ДНК фирмы «Qiagen» (США), наполнители для хроматографических колонок фирм «Pharmacia Biotech» (Швеция) и «Toyo Soda» (Япония), аминокислоты фирмы «Pierce» (Франция), радиоактивно меченные вещества фирмы «Amersham» (Англия), стекловолоконные фильтры фирмы «Whatman» (США), ПЭИ-целлюлоза фирмы «Merck» (ФРГ).

Получение химерной тРНК^{ProAla} и мутантных форм пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis*. Мутагенез гена тРНК^{Pro} *E. faecalis* в содержащей T7-промотор генно-инженерной конструкции на основе вектора *pUC18*, необходимый для введения в ее последовательность элементов узнавания аланил-тРНК синтетазой (рис. 1), проводили по методу QuickChange фирмы «Stratagene» [12] с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Мутированные гены проверяли секвенированием. Экспрессию и выделение тРНК^{ProAla} осуществляли аналогично таковому для тРНК^{Pro} *E. faecalis*, методика которых опубликована отдельно [12], за исключением коэкспрессии тРНК с *цис*-гидролитическим рибозимом.

Мутагенез гена пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis* проводили по методу QuickChange фирмы «Stratagene» [13], способ выделения и очистки белков описан в работе [12].

Анализ аминокислотирования. Реакционная смесь в объеме 130 мкл содержала 100 мМ трис-НСl, pH 8,0, 20 мМ MgCl₂, 0,5 мг/мл БСА, 3 мМ АТФ, 3 мМ пролин, 20 мкМ ¹⁴С-меченный пролин (85,0 мКи/ммоль), 5 или 10 мкМ тРНК^{Pro} (CGG) *Rhodospseudomonas palustris* и 5 нМ пролил-тРНК синтетазу или ее мутантные формы. В ходе реакции при температуре 37 °С из реакционной смеси отбирали аликвоты по 20 мкл, осаждали тРНК и аминокислот-тРНК 10 %-й ТХУ в объеме 200 мкл на холоду, после чего осадки переносили на фильтры, отмывали 50 мл 5 %-й ТХУ, высушивали и анализировали радиоактивность на жидкостном сцинтиляционном счетчике.

Аминокислотирование тРНК^{ProAla} ¹⁴С-меченым аланином. Аланил-тРНК^{ProAla} в объеме 0,5 мл получали при следующих концентрациях компонентов

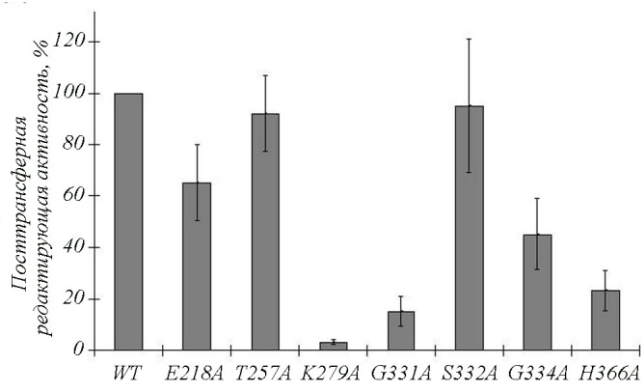


Рис. 2. Сравнение посттрансферной редактирующей активности мутантных форм пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis* с ее диким типом по начальной скорости реакции деацилирования (в процентах от активности дикого типа)

реакционной смеси: 600 нМ аланил-тРНК синтетаза из *Thermus thermophilus*, 15 мкМ тРНК^{ProAla}, 0,03 мМ аланин, 78 мкМ ¹⁴С-меченный аланин, 100 мМ трис-НСl, рН 7,5, 15 мМ MgCl₂, 0,5 мг/мл БСА, 3 мМ АТФ. Смесь инкубировали в течение 20 мин при $t = 37$ С, закисляли добавлением натрий-ацетатного буфера, затем очищали фенолом и хлороформом. После переосаждения этанолом осадок высушивали и растворяли в 40 мкл 0,1 М натрий-ацетатного буферного раствора, рН 4,0.

Анализ гидролиза аланил-тРНК^{ProAla}. Реакционная смесь в объеме 60 мкл содержала 60 нМ пролил-тРНК синтетазу *E. faecalis* либо ее мутантные формы, 100 мМ НЕРЕС, рН 7,0, 10 мМ MgCl₂, 0,1 мг/мл БСА, 2 мМ дитиотреитол (ДТТ), 3 мкл раствора ¹⁴С-аланил-тРНК^{ProAla}, получение которого описано выше. Реакцию проводили при $t = 37$ С, аликвоты по 5 мкл отбирали в нулевой точке через 1, 2, 3, 5 и 10 мин после начала реакции и наносили на стекловолоконные фильтры, пропитанные 10 %-й ТХУ. Затем фильтры промывали 5 %-й ТХУ, высушивали и анализировали на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Анализ гидролиза АТФ. Реакционная смесь в объеме 18 мкл содержала 100 мМ НЕРЕС, рН 7,5, 25 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 75 мкМ ¹⁴С-меченную АТФ (57,9 мКи/ммоль), 500 мМ аланин либо 250 мМ пролин, 15 мкМ тРНК^{Pro} и 2 мкМ пролил-тРНК синтетазу. В ходе реакции при $t = 37$ С отбирали аликвоты по 2 мкл, на-

носили их на ПЭИ-целлюлозу, после чего разделяли АТФ, АДФ и АМФ методом тонкослойной хроматографии в 0,75 М калий-фосфатном буфере, рН 3,5. Радиоактивность зон АТФ и АМФ анализировали на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Результаты и обсуждение. Для аланинового сканирования избраны позиции, гомологичные уже проявившим свое значение для посттрансферной редактирующей активности пролил-тРНК синтетазы *E. coli* [10], – T257, K279, H366; предложенные как составляющие активный центр редактирующего домена на основании структурных данных и компьютерного моделирования [11] – G331, S332; а также соседние с ним G334 и E218, находящиеся в районе соединения редактирующего домена с синтетическим доменом фермента. Для проверки редактирующей активности полученных мутантных форм фермента по гидролизу аланил-тРНК нами создана гибридная транспортная РНК, узнаваемая как пролиновой, так и аланиновой аминоксил-тРНК синтетазами. Для этого в последовательность гена пролиновой тРНК ввели элементы узнавания тРНК аланиновой (рис. 1).

Полученную химерную тРНК аминокислировали меченым аланином. Активность мутантных форм пролил-тРНК синтетазы оценивали по скорости гидролиза меченой аланил-тРНК. Данные по начальной скорости реакции деацилирования показали, что три из семи выделенных мутантных форм фермента (K279A, G331A и H366A) проявили существенно (в 4–50 раз) сниженную посттрансферную редактирующую активность: K279A демонстрирует 2 % активности по сравнению с таковой дикого типа, G331A – 16 %, H366A – 24 % (рис. 2).

Для дальнейшей характеристики мутантных форм, показавших существенное падение посттрансферной редактирующей активности при анализе деацилирования, проанализировали гидролиз АТФ, отображающий пре- и посттрансферное редактирование в сумме (рис. 3), и аминокислирование гомологичной аминокислотой (рис. 4). Исследование гидролиза АТФ в присутствии редактируемой аминокислоты (аланина) выявило те же тенденции к падению редактирующей активности у мутантных форм фермента, что и анализ деацилирования. При этом снижение аминокисли-

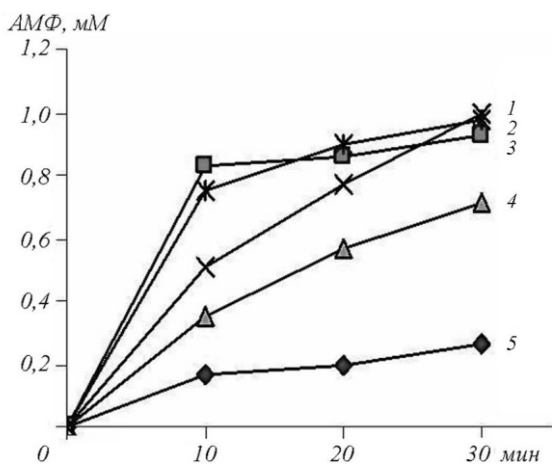


Рис. 3. Редактирование против аланина диким типом пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis* (3) и ее мутантными формами G331A (1), H366A (2) и K279A (4) в присутствии тРНК^{Pro} *R. palustris* (CGG); дикий тип без тРНК (5)

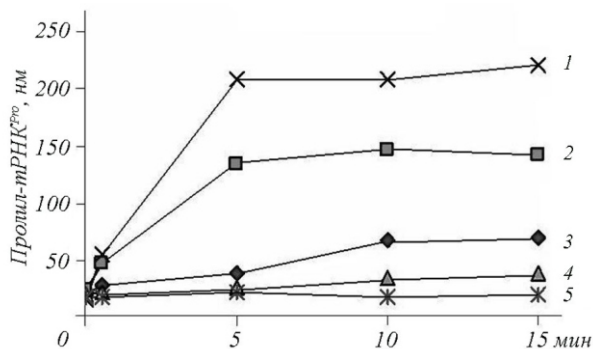


Рис. 4. Аминоацилирование тРНК^{Pro} *R. palustris* (CGG) диким типом пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis* (1) и ее мутантными формами G331A (2), K279A (3) и H366A (4); 5 – без белков

ющей активности мутантных форм не коррелирует с уменьшением активности редактирующей и, видимо, вызвано наведенными конформационными изменениями в синтетическом домене пролил-тРНК синтетазы. На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что мутации K279A, G331A и H366A специфически влияют на посттрансерное редактирование.

Полученные данные могут свидетельствовать о правомочности сделанных ранее [11] предположений о структуре активного деацилирующего сайта пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis*, не подтверждая при этом роли сближенных с деацилирующим активным сайтом аминокислотных остатков T257 и S332. Гомологичные аминокислотным остаткам

K279 и H369 пролил-тРНК синтетазы *E. coli* аминокислотные остатки пролил-тРНК синтетазы *E. faecalis* K279 и H366 имеют сходное с ними [10] значение для деацилирования аланил-тРНК^{ProAla}, что свидетельствует в пользу общности механизмов посттрансерного редактирования пролил-тРНК синтетазы обеих бактерий, несмотря на их относительную филогенетическую удаленность.

Боковая цепь лизина K279, как показывают структурные данные, обращена в сторону от остальных элементов предполагаемого активного центра и, возможно, участвует в связывании акцепторного конца аланил-тРНК^{Pro} [11]. Как в пролил-тРНК синтетазе *E. faecalis*, так и в ферменте *E. coli* [10] замена лизина K279 на аланин оказывает наибольшее влияние на посттрансерную редактирующую активность по сравнению со всеми изученными аминокислотными остатками. По-видимому, его роль заключается в позиционировании субстрата в активном центре редактирующего домена и по этой причине оказывается ключевой для осуществления ферментом посттрансерной редактирующей функции.

Значение гистидина H366, а также глицина G331, образующего водородную связь с его боковой цепью, очевидно, состоит в поддержании оптимальной структуры деацилирующего активного центра. Замена гомологичного гистидина H369 на аланин либо цистеин в ферменте *E. coli* приводила не только к падению посттрансерной редактирующей активности, но и к нарушению специфичности деацилирования и гидролизу пролил-тРНК^{Pro} [10]. Узнавание такими мутантными формами белка большего по размеру субстрата может свидетельствовать о нарушении целостности кармана, в котором располагается редактируемый аминокислотный остаток [10, 11]. То же обстоятельство может влиять и на связывание субстрата, и на эффективность катализа, объясняя снижение посттрансерной редактирующей активности.

На основании полученных данных можно полагать, что вряд ли боковая цепь какого-либо из изученных аминокислотных остатков непосредственно участвует в катализе реакции деацилирования. При этом нельзя исключить роли химических групп основной цепи, на пространственное поло-

жение которых мутагенез мог не оказать решающего влияния непосредственно в катализе, в координировании ответственного за катализ иона либо молекулы воды. В любом случае механизм деацилирования аланил-тРНК^{Pro} в активном центре редактирующего домена бактериальных пролил-тРНК синтетаз остается пока невыясненным.

K. S. Boyarshin, I. A. Kriklivyi, A. V. Rayevsky, A. A. Himin, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Study on the putative active site of *Enterococcus faecalis* prolyl-tRNA synthetase editing domain by methods of site-directed mutagenesis

Summary

The maintenance of amino acid specificity by aminoacyl-tRNA synthetases can require the hydrolysis of missynthesized products that is known as amino acid editing. Bacterial prolyl-tRNA synthetase includes a special editing domain, that deacylates alanyl-tRNA^{Pro}, and so exhibits post-transfer editing activity. The mechanism of tRNA-dependent editing by prolyl-tRNA synthetase has to be defined. The present work aim is to study the structure of the active site of enterobacteria *E. faecalis* prolyl-tRNA synthetase editing domain. The amino acids positions E218, T257, K279, G331, S332, G334, and H366 have been chosen for the site-directed mutagenesis (alanine scanning). An editing activity of the mutants was compared with the wild type prolyl-tRNA synthetase. Three amino acid residues, important for the editing activity, K279, G331 and H366, were revealed. This data are consistent with the existing suppositions about the structure of bacterial prolyl-tRNA synthetase deacylating active site.

Keywords: prolyl-tRNA synthetase, editing, tRNA, site-directed mutagenesis.

K. C. Бояршин, I. A. Крикливий, O. B. Расвський, A. O. Хімін, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Передбачуваний активний центр редагуючого домену пролил-тРНК синтетази бактерії *Enterococcus faecalis*

Резюме

Забезпечення амінокислотної специфічності аміноацил-тРНК синтетаз інколи потребує проведення гідролізу помилково синтезованих продуктів, відомого як амінокислотне редагування. Бактеріальні пролил-тРНК синтетази містять спеціальний редагуючий домен, що деацилює аланіл-тРНК^{Pro} і таким чином проявляє посттрансферну редагуючу активність. Механізм тРНК-залежного редагування пролил-тРНК синтетазою лишається невстановленим. Мета цієї роботи полягала у визначенні структури активного центра редагуючого домену пролил-тРНК синтетази *E. faecalis*. Амінокислотні позиції E218, T257, K279, G331, S332, G334, H366 обрано для сайт-спрямованого мутагенезу (аланінового сканування), а редагуючу активність мутантних форм зіставлено з активністю пролил-тРНК синтетази дикого типу. Знайдено три амінокислотних залишки, важливі для посттрансферної редагуючої активності ферменту, – K279, G331 і H366. Отримані дані підтверджують існуючі припущення щодо структури ак-

тивного центра редагуючого домену бактеріальних пролил-тРНК синтетаз.

Ключові слова: пролил-тРНК синтетаза, редагування, тРНК, сайт-спрямований мутагенез.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jakubowski H., Goldman E. Editing of errors in selection of amino acids for protein synthesis // *Microbiol. Rev.*–1992.–**56**, N 3.–P. 412–429.
2. Lincecum T. L., Tukalo M., Yaremchuk A., Mursinna R. S., Williams A. M., Sproat B. S., Van Den Eynde W., Link A., Van Calenbergh S., Grotli M., Martinis S. A., Cusack S. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase // *Mol. Cell.*–2003.–**11**, N 4.–P. 951–963.
3. Fukunaga R., Yokoyama S. Structural basis for non-cognate amino acid discrimination by the valyl-tRNA synthetase editing domain // *J. Biol. Chem.*–2005.–**280**, N 33.–P. 29937–29945.
4. Fukunaga R., Yokoyama S. Structural basis for substrate recognition by the editing domain of isoleucyl-tRNA synthetase // *J. Mol. Biol.*–2006.–**359**, N 4.–P. 901–912.
5. Sasaki H. M., Sekine S., Sengoku T., Fukunaga R., Hattori M., Utsunomiya Y., Kuroishi C., Kuramitsu S., Shirouzu M., Yokoyama S. Structural and mutational studies of the amino acid-editing domain from archaeal/eukaryal phenylalanyl-tRNA synthetase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–2006.–**103**, N 40.–P. 14744–14749.
6. Waas W. F., Schimmel P. Evidence that tRNA synthetase-directed proton transfer stops mistranslation // *Biochemistry.*–2007.–**46**, N 43.–P. 12062–12070.
7. Beuning P. J., Musier-Forsyth K. Hydrolytic editing by a class II aminoacyl-tRNA synthetase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*–2000.–**97**, N 16.–P. 8916–8920.
8. Wong F. C., Beuning J., Silvers C., Musier-Forsyth K. An isolated class II aminoacyl-tRNA synthetase insertion domain is functional in amino acid editing // *J. Biol. Chem.*–2003.–**278**, N 52.–P. 52857–52864.
9. Hati S., Ziervogel B., SternJohn J., Wong F. C., Nagan M. C., Rosen A. E., Siliciano P. G., Chihade J. W., Musier-Forsyth K. Pre-transfer editing by class II prolyl-tRNA synthetase: role of aminoacylation active site in «selective release» of noncognate amino acids // *J. Biol. Chem.*–2006.–**281**, N 38.–P. 27862–27872.
10. Wong F. C., Beuning P. J., Nagan M., Shiba K., Musier-Forsyth K. Functional role of the proline-tRNA synthetase insertion domain in amino acid editing // *Biochemistry.*–2002.–**41**, N 22.–P. 7108–7115.
11. Crepin T., Yaremchuk A., Tukalo M., Cusack S. Structures of two bacterial prolyl-tRNA synthetases with and without a cis-editing domain // *Structure.*–2006.–**14**.–P. 1511–1525.
12. Boyarshin K. S., Kriklivyi I. A., Tukalo M. A. tRNA-dependent editing of errors by prolyl-tRNA synthetase from bacteria *Enterococcus faecalis* // *Ukr. Biochem. J.*– 2008.–**79**, N 6.–P. 40–44.
13. QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit, instruction manual, catalog #200516.–La Jolla, 2005.–P. 1–15.

УДК 577.217.32

Надійшла до редакції 25.09.07