

ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих

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

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

Проведены ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование кДНК-фрагмента, кодирующего N-концевой нуклеотидсвязывающий домен (свертку Россмана) тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих. Впервые обнаружен уникальный вариант консервативного HIGH-подобного мотива, HVAY, в котором остаток глицина, считавшийся ранее абсолютно консервативным для всех аминоктил-тРНК синтетаз I структурного класса, заменен на остаток аланина.

Введение. Аминоацил-тРНК синтетазы (АРСазы, КФ 6. 1. 1.) — ключевые ферменты аппарата биосинтеза белка клетки [1]. В последние годы были достигнуты значительные успехи в исследовании первичной и пространственной структуры синтетаз из прокариот и низших эукариот, что позволило выделить два структурных класса АРСаз [2, 3]. АРСазы I класса содержат нуклеотидсвязывающий домен — свертку Россмана, — обнаруженную ранее в дегидрогеназах [4], и характеризуются наличием консервативных структурных мотивов HIGH и KMSKS в N-концевом домене [3, 5]. Для АРСаз класса II характерно наличие трех других относительно консервативных последовательностей в различных частях полипептидной цепи, а в их пространственной структуре вместо свертки Россмана имеется альтернативный АТР-связывающий домен [6, 7]. Следует отметить, что АРСазы высших эукариот отличаются более сложной структурой по сравнению с их прокариотическими аналогами и обычно имеют N- или C-концевые удлинения полипептидной цепи, обусловленные необходимостью выполнения ими некоторых дополнительных функций [8].

Тирозил-тРНК синтетаза (КФ 6. 1. 1. 1) из печени быка, выделенная и изученная нами ранее [9—13], представляет собой димер α_2 -типа с молекулярной массой 2×59 кДа. Иммунохимическое исследование тирозил-тРНК синтетазы с использованием моноклональных антител [10] показало наличие антигенной детерминанты, которая эволюционно приобретена только тирозил-тРНК синтетазами высших эукариот и отсутствует у низших эукариот (дрожжи) и бактерий [11]. С использованием методов селективных химических модификаций изучена структура активного цент-

*Correspondence address.

© О. В. ЛЕВАНЕЦ, В. Г. НАЙДЕНОВ, М. И. ВУДМАСКА, К. А. ОДЫНЕЦ, Г. Х. МАЦУКА,
А. И. КОРНЕЛЮК, 1996

ра бычьей тирозил-тРНК синтетазы и установлена функциональная роль остатков гистидина и лизина в реакции аминокислотирования тРНК^{Tyr} [12, 13].

Для дальнейшего структурно-функционального анализа эукариотической тирозил-тРНК синтетазы необходимо знание ее первичной структуры. В данной работе нами определена первичная структура N-концевого полипептидного фрагмента бычьей тирозил-тРНК синтетазы путем ПЦР-амплификации, клонирования и секвенирования соответствующего кДНК-фрагмента.

Материалы и методы. Получение и секвенирование пептидных фрагментов. Тирозил-тРНК синтетазу печени быка, выделенную, как описано ранее [9], дополнительно очищали ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке RP-304 («BioRad», США) или Nucleosil C-18 («Macherey-Nagel»). Белок расщепляли BrCN по стандартной методике в 70 %-м растворе муравьиной кислоты при соотношении BrCN/Met = 60 (или больших), используя 1—10 М раствор BrCN в ацетонитриле. Полученные BrCN-фрагменты разделяли обращеннофазовой ВЭЖХ, длину пептидных фрагментов определяли гель-электрофорезом. N-концевые аминокислотные последовательности фрагментов BrCN-расщепления белка определяли на газофазном секвенаторе фирмы «Applied Biosystems» (модель 477A), снабженном автоматическим анализатором РТН-аминокислот (модель 120A).

Выбор праймеров для полимеразной цепной реакции. Для проведения ПЦР синтезированы две пары олигонуклеотидных праймеров:

1) Z2 (+)-праймер 5'-AAGAGAAACTGCACCTTATCACCCG-3'

PM (-)-праймер 5'-GCCTGTТААТCCTGGAACCATAGG-3';

2) Z3(+)-праймер 5'-GAGAATTCAAGAGAAACTGCACCTTATCACCCG-3'

PM2 (-)-праймер 5'-GAGGATCCGCCTGTТААТCCTGGAACCATAGG-3'.

Вторая пара праймеров содержит сайты рестрикции *EcoRI* и *BamHI* соответственно для последующего клонирования продукта ПЦР. Синтез олигонуклеотидных праймеров проведен фирмой «Biomaster» (Москва).

Проведение полимеразной цепной реакции Реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 150 нг матричной ДНК (в качестве матрицы использован суммарный препарат кДНК печени быка), 20 пмоль каждого праймера, 200 мкмоль каждого dNTP, 1×реакционный буфер и 3 ед. ДНК-полимеразы *TetZ* («Biomaster», Москва). Проводили 30 циклов амплификации по следующей программе: денатурация матрицы в течение 40 с при 94 °С, отжиг праймеров в течение 60 с при 60 °С, достройка праймеров в течение 90 с при 72 °С. В первом цикле денатурацию матрицы осуществляли в течение 90 с, после завершения реакции образец дополнительно инкубировали при 72 °С в течение 10 мин. Для последующего клонирования продукт реакции с использованием праймеров Z2 и PM затем реамплифицировали в присутствии праймеров Z3 и PM2, содержащих «липкие» концы.

Клонирование продуктов ПЦР. Продукт ПЦР, полученный с использованием праймеров Z3 и PM2, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *BamHI* и лигировали с обработанной указанными рестриктазами ДНК плазмиды *pUC119*. Лигазную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* XL-1 Blue, полученных согласно [14]. Рекомбинантные клоны анализировали методом рестрикционного анализа по сайтам *EcoRI* и *BamHI* и амплификацией плазмидной ДНК рекомбинантных клонов с использованием специфических праймеров Z3 и PM2. При клонировании продуктов ПЦР использовали эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *BamHI* производства «Biomaster», набор для лигирования «Ready-To-Go T4 DNA Ligase» («Pharmacia Biotech»).

Секвенирование ДНК. Из полученных рекомбинантных клонов выделяли плазмидную ДНК методом щелочного лизиса [15]. ДНК секвенировали

по методу Сэнгера с помощью стандартных M13 прямого и обратного праймеров. Использовали набор реактивов «Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit» («USB»), радиоактивные изотопы [α - 32 P]dATP («Радиопрепарат», Ташкент) и [α - 35 S]dATP («Amersham», Англия). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью пакета программ PCGENE.

Результаты и обсуждение. Аминокислотные последовательности BrCN-фрагментов бычьей тирозил-тРНК синтетазы были определены как для основной формы тирозил-тРНК синтетазы (M_r 2 × 59 кДа), так и для ее протеолитически модифицированной формы (2 × 39 кДа). Сравнение полученных аминокислотных последовательностей с первичной структурой дрожжевой цитоплазматической тирозил-тРНК синтетазы (P36421) [16] показало, что три BrCN-пептида гомологичны участкам 61—86, 109—140 и 218—254 дрожжевой синтетазы.

Для амплификации специфической последовательности кДНК, кодирующей фрагмент тирозил-тРНК синтетазы печени быка, были выбраны праймеры Z2 и PM. Последовательность праймера PM выведена на основе анализа гомологии возможной нуклеотидной последовательности, кодирующей BrCN-пептид тирозил-тРНК синтетазы печени быка, и последовательности F11457 (GenBank), отнесенной к изоогам тирозил-тРНК синтетазы человека. Праймер Z2 выбран как часть экспрессируемой последовательности человека Z13627 (GenBank), гомологичной дрожжевой цитоплазматической тирозил-тРНК синтетазе [16]. Выбранные праймеры анализировали с помощью программы PCRPLAN из пакета PCGENE.

В результате проведения ПЦР с использованием праймеров Z2 и PM синтезирован продукт длиной около 600 п. н., который затем реамплифицировали с Z3 и PM2, содержащими сайты рестрикции *EcoRI* и *BamHI*

```

      10      20      30      40      50      60      70
GGAACTGCAGGAGGCTCTCGGGGAAGAGAAGCTGAAGCAGATACTGAAGGAGCGAGAACTTAAAGTTTACT
  N L Q E A L G E E K L K E I L K E R E L K V Y

      80      90      100     110     120     130     140
GGGGACAGCAACTACAGGCAAGCCACATGTGGCTTACTTTGTGCCCATGTCTAAGATCGCAGACTTCTCTGA
  W G T A T T G K P H V A Y F V P M S K I A D F L

     150     160     170     180     190     200     210
AAGCAGGATGTGAGGTAACGATTCTGTTTGGCGACCTGCACGCATACCTGGATAACATGAAGGCTCCGTGGG
  K A G C E V T I L F A D L H A Y L D N M K A P W

     220     230     240     250     260     270     280
ACGTTTCTAGAACTTCTGAACACAGCTATTATGAGAATGTGATCAAGGCAATGCTGGAGAGCATTGGGGTCCCCT
  D V L E L R T S Y Y E N V I K A M L E S I G V P

    290     300     310     320     330     340     350     360
TAGAGAAGCTCAGGTTTCATCAAAGGCACTGATTACCAGCTCAGCAAAGAGTACACGCTGGATGTCTACCGCC
  L E K L R F I K G T D Y Q L S K E Y T L D V Y R

     370     380     390     400     410     420     430
TCTCTTCTGTGGTCAACAGCAGCATGCCAAAAAGCTGGAGCTGAGGTGGTAAAGCAGGTGGAGCACCCCTC
  L S S V V T Q H D A K K A G A E V V K Q V E H P

     440     450     460     470     480     490     500
TGCTGAGTGGCCTGCTGTACCCCGGGCTGCAGGCCTTGGATGAAGAATACTTGAAGTGGATGCCCACTTTG
  L L S G L L Y P G L Q A L D E E Y L K V D A Q F

     510     520     530     540     550     560     570
GAGGTGTTGATCAGAGAAGATTTTACCTTTGCAGAGAAGTACCTCCCTGCACCTGGTTACTCAAACGAA
  G G V D Q R K I F T F A E K Y L P A P G Y S K R

     580     590
TCCATCTGATGAAT
  I H L M N

```

соответственно, для его последующего клонирования в заданной ориентации. Секвенированием по Сэнгеру определена полная нуклеотидная последовательность ПЦР-амплифицированного фрагмента ДНК, длина которого составила 638 п. н. На схеме 1 приведена нуклеотидная последовательность расшифрованного кДНК-фрагмента (без последовательности праймеров), а также выведенная соответствующая аминокислотная последовательность.

Анализ аминокислотной последовательности показал, что внутренние фрагменты MSKI...LDN и MLKS...YRL соответствуют последовательностям пептидов BtCN-расщепления B11 88 и B14 91 соответственно. Это позволяет считать, что амплифицированный кДНК-фрагмент действительно кодирует часть полипептидной цепи бычьей тирозил-тРНК синтетазы.

На схеме 2 представлено сравнение аминокислотной последовательности, кодируемой полученным ДНК-фрагментом (YBta — бык, *Bos taurus*), с тирозил-тРНК синтетазами низших эукариот (YSce — дрожжи, *Saccharomyces cerevisiae*, Swiss-Prot P36421, [16]) и прокариот (YEco — *E. coli*, Swiss-Prot P00951, [17]) и YBst — *Bacillus stearothermophilus*, Swiss-Prot P00952, [18]). Отмечены консервативные аминокислотные остатки и положение мотива HIGH.

В расшифрованной нами аминокислотной последовательности тирозил-тРНК синтетазы высших эукариот впервые обнаружен уникальный вариант консервативного HIGH-подобного мотива, а именно: 49-HVAY-52, в котором остаток глицина, считавшийся ранее абсолютно консервативным у всех АРСаз I класса [3], заменен на остаток аланина. Можно предположить, что эта необычная аминокислотная замена не меняет существенно характера участия этого мотива в функции синтетазы, т. е. в образовании участка связывания аденинового кольца АТР, как это описано для тирозил-тРНК синтетазы *B. stearothermophilus* [19].

	HIGH-мотив										
	L	L	I	Y	G	T	H				
	1	20	40	60							
YBta	^NLQEA.LGEEKLKEILK..ERE LKVVWGTATTG.KPHVAYFVPMKIA									
YSce	MSSAATVDPNEAFGLITKNLQEV.LNPQIIKDVLEVQKRH LKLWGTAPTG.RPHCGYFVPMTKLA										
YEco	MASSNLTKQLQERGLVAGVTDDEEALAERLA..QGP IALYCGPDPTADSLHLGHLVPLLCCLK									
YBst	MDLLAELQWRGLVWQTDEDEGLRKLN..EER VTLYCGPDPTADSLHIGHLATILTMR									

Свертка Россмана, часть I

	F	AG	L	D	K	L	F				
	80	100	120								
YBta	DFLKAGCEVTILFADLHAYL.DN.NKAPWDVLELRTSYVENVIKAMLESIGVPLEKLRFIKGTDYQL										
YSce	DFLKAGCEVTLLADLHAPL.DN.NKAPLEVVVYRAKYVELTIRAILRSINVPTEKLFVVGSSYQL										
YEco	RFQQAGHKPVALVGGATGLIGDPSFKAAERKLNTEETVQGEWVDK.IRKQVAPP...LDPDCGENSAI										
YBst	RFQQAGHRPIALVGGATGLIGDPSCKKSEKERTLNARETVEAWSAR.IKEQLGRF...LDFEADGNPAI										

Соединительный полипептид I

	I	L	V	I	Y	Q	D	L
	140	160	180	200				
YBta	SKEY.....TLDVYR.LSSVVTQHDARKAGA.EVVKQVEHP.....LLISGLLYPGLQALDEEYL							
YSce	TPDY.....TMDIFR.LSNIVSQNDARKAGA.DVVKQVANP.....LLISGLIYPLMQALDEQFL							
YEco	AANNYDWFGNMNVLTFLRDIGKHFVSNQMINKEAVKQRLNREDQGISF TEFSYNLLQGYDFACL							
YBst	IKNNYDWFGLDVTFLRDVGGKHFVSNYMMAKESVQSRIE...TGISF TEFSYMLQAYDFLRL							

Свертка Россмана, часть II

	Q	GG	DQ	L	P
	80	200			
YBta	K...VDAQFGGVDQRKIFTFAEKYLPAI.GYSKRHLMNP^..				
YSce	D...VDCQFGGVDQRKIFVLAEEENLPSI.GYKKAHLNMP^..				
YEco	NKQYGVVLQIGGSDQWGNITSGIDLTRRLH.QNQVFGLTVP^..				
YBst	YETEGCRLQIGGSDQWGNITAGLELIRKTKGEARAFGLTIP^..				

Из сравнения аминокислотных последовательностей тирозил-тРНК синтетаз быка и дрожжей видно, что участок 72-LFADLNHAYL-80 очень консервативен. Его положение при выравнивании аминокислотных последовательностей примерно соответствует таковому характерного мотива IGDP, имеющегося у большинства тирозил-тРНК синтетаз прокариот и митохондрий и вовлеченного через остаток Asp во взаимодействие с субстратным L-тирозином (D78 у тирозил-тРНК синтетазы *B. stearothermophilus* [19]). Можно предположить по аналогии ту же функцию и для остатка D75 у эукариотических тирозил-тРНК синтетаз.

В аминокислотной последовательности фрагмента бычьей тирозил-тРНК синтетазы можно выделить элементы нуклеотидсвязывающего фрагмента (свертки Россмана): части I и II, которые разделены соединительным полипептидом I (см. схему 2). Следует отметить, что в обеих частях свертки Россмана наблюдается более высокая гомология аминокислотных последовательностей эукариотических и бактериальных тирозил-тРНК синтетаз, чем в области соединительного полипептида.

Данная последовательность нуклеотидсвязывающего фрагмента тирозил-тРНК синтетазы быка депонирована в GenBank под номером X96373.

О. В. Леванец, В. Г. Найденов, М. I. Вудмаска, К. О. Одионец, Г. Х. Мацука, О. I. Корнелюк

ПЛР-ампліфікація, клонування та секвенування фрагмента кДНК, що кодує нуклеотидзв'язуючий домен тирозил-тРНК синтетазу ссавців

Резюме

Проведено ПЛР-ампліфікацію, клонування та секвенування кДНК-фрагмента, що кодує N-кінцевий нуклеотидзв'язуючий домен (згортку Россмана) тирозил-тРНК синтетазу ссавців. Вперше виявлено унікальний варіант консервативного HIGH-подібного мотиву, HVAY, у якому залишок гліцину, що раніше вважався абсолютно консервативним для всіх АРСаз I структурного класу, замінений на залишок аланіну.

O. V. Levanets, V. G. Naidenov, M. I. Woodmaska, K. A. Odynets, G. H. Matsuka, A. I. Kornelyuk

PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleotide binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase

Summary

cDNA fragment encoding the N-terminal nucleotide binding domain (Rossmann fold) of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase has been PCR-amplified, cloned and sequenced. The unique variant of conservative HIGH-like motif, HVAY, where glycine residue was substituted by alanine, has been observed for the first time.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Киселев Л. Л., Фаворова О. О., Лаврик О. И. Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК.—М.: Наука, 1984.—405 с.
2. Schimmel P. Classes of APSases and the establishment of the genetic code // TIBS.—1991.—16, N 1.—P. 1—3.
3. Moras D. Aminoacyl-tRNA synthetases // Curr. Biol.—1992.—2.—P. 138—142.
4. Rossmann M. G., Moras D., Olsen K. W. Chemical and biological evolution of a nucleotide binding domain // Nature.—1974.—250.—P. 194—199.
5. Bhat T. N., Blow D. M., Brick P. Tyrosyl-tRNA synthetase forms a mononucleotide binding fold // J. Mol. Biol.—1982.—158.—P. 699—709.
6. Eriani G., Delaure M., Poch O. et al. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs // Nature.—1990.—347.—P. 203—206.
7. Cusack S., Berthet-Colominas C., Hartlein M. et al. A second class of synthetases structure revealed by X-rays analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å // Ibid.—P. 249—255.
8. 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.

9. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК-синтаза из печени быка. Выделение и физико-химические свойства // Молекуляр. биология.—1988.—22, № 1.—С. 176—186.
10. Рибкинская Т. А., Вартамян О. А., Филоненко В. В. и др. Метод селекции гибридом, секретирующих моноклональные антитела, основанный на энзиматической активности фермента // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 4.—С. 97—101.
11. Рибкинская Т. А., Корнелюк А. И., Берестень С. Ф., Мацука Г. Х. Иммунохимический подход к изучению структуры тирозил-тРНК-синтазы из печени быка // Там же.—1991.—7, № 6.—С. 33—36.
12. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Мацука Г. Х. Тирозил-тРНК синтаза из печени быка. Изучение функциональной роли остатков гистидина // Биоорг. химия.—1991.—17, № 8.—С. 1033—1037.
13. Гнатенко Д. В., Корнелюк А. И., Лаврик О. И. Химическая модификация остатков лизина тирозил-тРНК синтазы из печени быка с помощью пиридоксаль-5'-фосфата // Биохимия.—1991.—56, № 11.—С. 56—60.
14. Nishimura A., Morita M., Nishimura J., Sugino J. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *E. coli* cells // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 6169.
15. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA // Ibid.—1979.—7.—P. 1513—1522.
16. Chow C. M., RajBhandary U. L. *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase gene // J. Biol. Chem.—1993.—268, N 17.—P. 12885—12863.
17. Barker D. G., Bruton C. J., Winter G. The tyrosyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. Complete nucleotide sequence of the structural gene // FEBS Lett.—1982.—150.—P. 419—423.
18. Winter G., Koch G. L. E., Hartley B. S., Barker D. G. The amino acid sequence of tyrosyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus* // Eur. J. Biochem.—1983.—132.—P. 383—387.
19. Brick P., Bhat T. N., Blow D. M. Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 Å resolution. Interaction of the enzyme with tyrosyl adenylate intermediate // J. Mol. Biol.—1988.—208.—P. 83—98.