

Функциональная роль С-концевого домена лейцил-тРНК синтетазы *Thermus thermophilus*

О. И. Гудзера, А. Д. Яремчук, М. А. Тукало

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

mtukalo@imbg.org.ua

Цель. Исследовать роль С-концевого домена лейцил-тРНК синтетазы *T. thermophilus* (ЛейРСТТ) в реакциях аминоацилирования и редактирования. **Методы.** Мутант ЛейРСТТ без С-концевого домена (ΔC) получен методом мутагенеза. Кинетические константы в реакции аминоацилирования ЛейРС и ее мутанта ΔC определяли методами ферментативной кинетики стационарного состояния. Для оценки вклада С-концевого домена во взаимодействие фермента с тРНК^{Leu} методом флуоресцентного титрования рассчитаны K_d комплекса тРНК с ЛейРСТТ и ее мутантом ΔC . **Результаты.** Показано, что С-концевой домен играет существенную роль в реакциях аминоацилирования и редактирования ЛейРСТТ и не существен для активности в реакции активации аминокислоты. Определены также кинетические параметры в реакции аминоацилирования ЛейРС и ΔC мутанта для тРНК^{Leu} и тРНК^{Tyr}, анализ которых свидетельствует о том, что С-домен не является критическим для проявления специфичности фермента в узнавании гомологичной тРНК. В то же время выявлено значительное влияние С-концевого домена на величину каталитической константы реакции аминоацилирования. Делеция последнего приводит к снижению k_{cat} в 152 раза. **Выводы.** С-концевой домен ЛейРСТТ эволюционно приобретен для повышения скорости катализа в реакциях аминоацилирования и редактирования и не вносит существенного вклада в обеспечение специфичности фермента при узнавании тРНК.

Ключевые слова: лейцил-тРНК синтетаза, тРНК^{Leu}, редактирование.

Введение. Высокая точность передачи генетической информации является необходимым условием функционирования живых организмов. Большое значение в этом имеют аминоацил-тРНК синтетазы (АРСаза), которые катализируют двухстадийную реакцию присоединения соответствующей аминокислоты к 3'-концевому аденозину специфической тРНК и выполняют важную роль в процессе трансляции генетической информации. Каждая АРСаза выбирает специфическую аминокислоту из 20 присутствующих в клеточном пуле. Некоторые аминокислоты имеют очень сходные размеры и химичес-

кую структуру боковых цепей, что иногда приводит к некорректной активации аминокислоты и некорректному аминоацилированию тРНК. Вследствие этого целый ряд АРСаз (ИлейРС, ЛейРС, ВалРС, АлаРС, ТреРС, ПроРС и ФенРС) обладают редактирующей активностью, благодаря которой происходит гидролиз ошибочного аминоациладенилата (претрансферное редактирование) или ошибочной аминоацил-тРНК (посттрансферное редактирование) [1]. На основании консервативных последовательностей и характерных структурных мотивов 20 АРСаз разделены на два класса – по 10 в каждом [2, 3]. Изучаемая нами лейцил-тРНК синтетаза *T. thermophilus* (ЛейРСТТ) относится к классу

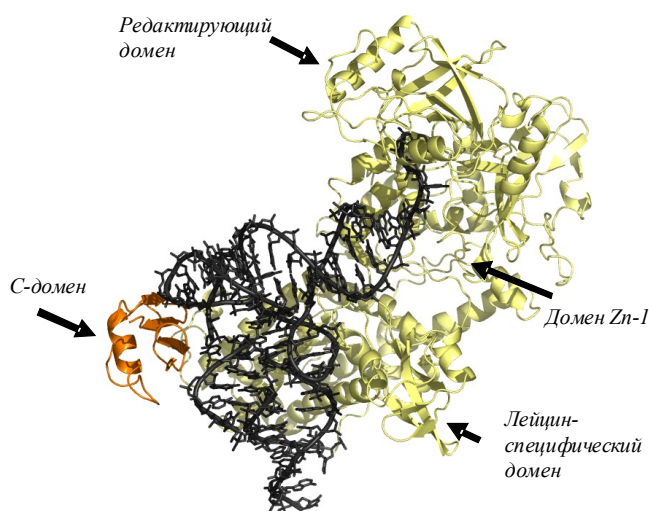


Рис. 1. Модель пространственной структуры комплекса ЛейРС–тРНК^{Leu} из *T. thermophilus* (3,3 Å) [6]

1а, к которому также принадлежат валил- и изолейцил-тРНК синтетазы.

Кристаллическая структура ЛейРСТТ выяснена в присутствии различных субстратов, включая тРНК^{Leu} [4–7]. Пространственная структура этого фермента имеет удлиненную форму, характерную для всех АРСаз класса 1а, и сложное модульное строение [5]. В ее состав входят четыре четких модуля-включения (редактирующий домен, домен Zn-1, лейцин-специфический домен и С-домен), подвижно соединенных с телом макромолекулы через экспонированные в раствор β-тяжи (рис. 1).

Редактирующие домены (CP1) являются уникальными для лейцил-, изолейцил- и валил-тРНК синтетаз, однако они имеют различные точки включения в полипептидной цепи молекулы фермента. После детального сравнения первичных структур АРСаз установлено, что у археобактериальных, эукариотных ЛейРС и всех изолейцил- и валил-тРНК синтетаз редактирующий домен находится между двумя частями домена Zn-1, тогда как у бактериальных и митохондриальных ЛейРС этот домен расположен после домена Zn-1. Характерной особенностью АРСаз класса 1а является наличие менее консервативного С-домена, который (в отличие от других АРСаз) не взаимодействует с антикодоном в процессе узнавания тРНК [8]. Этот домен, состоящий приблизительно из 60 аминокислотных остатков (а. о.), связан с телом молекулы

через подвижный линкер и взаимодействует с углом L-формы РНК^{Leu}. С-концевой домен ЛейРСТТ (а. о. 815–878), который не виден в структуре свободного фермента [5, 6], в комплексе ЛейРС с тРНК^{Leu} представляет собой компактный альфа-бета-домен и расположен над третичной парой оснований тРНК G19–C56.

В ряде работ изучено влияние делеции С-домена ЛейРС из различных объектов на аминокислотную и редактирующую активности фермента. Так, для усеченной ЛейРС *Pyrococcus horikoshii* [9] показано полное отсутствие аминокислотной активности, в то время как активность в реакции активации аминокислоты в три раза выше по сравнению с таковой полноразмерного фермента. Интересно, что делеция С-концевого домена практически не влияет на редактирующую активность ЛейРС *P. horikoshii*. В работе [10] сопоставлены активности в биосинтезе белка для ΔС-мутантов ЛейРС *Escherichia coli* и митохондрий дрожжей. В отсутствие С-домена фермент из *E. coli* полностью теряет аминокислотную и редактирующую активности, тогда как делеция С-концевого домена ЛейРС из митохондрий дрожжей повышает указанные активности. ΔС-мутанты ЛейРС *E. coli* и митохондрий дрожжей активируют лейцин так же, как соответствующие ферменты дикого типа.

Таким образом, роль С-домена в функционировании ЛейРС окончательно не выяснена. В связи с тем, что для ЛейРСТТ кристаллическая структура комплекса фермента с тРНК^{Leu} известна, представляет интерес изучение функциональной роли ее С-концевого домена.

Материалы и методы. В работе использованы трис, NEPES («ICN Biomedicals», США), ДЭАЭ-сефароза, гепарин-сефароза («Pharmacia», Швеция), MgCl₂, ЭДТА, Norit А, ПЭИ-целлюлоза («Merck», ФРГ), тРНК^{Leu} и тРНК^{Tyr} («Boehringer», ФРГ), ¹⁴С-лейцин (238 мКи/ммоль) (Институт исследования, производства и использования изотопов, Чехия), [¹⁴С]изолейцин (318 мКи/ммоль), [¹⁴С]АТФ (50 мКи/ммоль) фирмы «Amersham» (Англия). Остальные реагенты имеют квалификацию «осч» и «хч».

Очистка нативной и мутантной ЛейРС T. thermophilus. ЛейРСТТ (а. о. 1–878) и ΔС-мутант ЛейРСТТ (а. о. 1–812) клонированы [10], секвенирова-

ны и суперэкспрессированы в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE 3) pLysS [4]. Высокоочищенные препараты ЛейРСТТ дикого типа и ее делетированной формы (ЛейРСТТ ΔС) выделяли, как описано в работе [11].

Мутагенез гена ЛейРСТТ проводили согласно [12].

Определение активности ЛейРС в реакции аминокислотирования тРНК^{Leu}. Реакцию аминокислотирования тРНК^{Leu} осуществляли при $t = 37^\circ\text{C}$ в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 100 мМ трис-НСl, рН 7,9, 15 мМ MgCl₂, 2 мМ АТР, 25 мкМ [¹⁴С]лейцин, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 4 мг/мл суммарной тРНК *E. coli*. Реакцию инициировали добавлением 10 нМ ЛейРС. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 10 мкл и наносили на бумажные фильтры Whatman 3ММ, предварительно обработанные 10 %-м раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ), трижды промывали 5 %-й ТХУ и один раз – этанолом. Фильтры высушивали, их радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике RackBeta («ЛКВ», Швеция).

Определение активности ЛейРС в реакции АТР-PP_i-обмена. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,9, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 15 мМ KCl, 1 мМ лейцин, 1 мМ [³²Р]пирофосфат аммония. Реакцию инициировали добавлением 10 нМ ЛейРС и инкубировали при температуре 37 °С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 15 мкл и вносили их в 200 мкл смеси, содержащей 2 %-й активированный уголь (Norit A), 5 %-ю ТХУ и 0,2 М пирофосфат натрия.

Смесь фильтровали через стеклянные фильтры Whatman GF/C, промывали водой, а затем 5 мл 2 %-го раствора поливинилового спирта. Радиоактивность фильтров определяли на сцинтилляционном счетчике RackBeta.

Получение ошибочно аминокислотированной изолейцил-тРНК^{Leu}. Реакционная смесь для препаративного получения изолейцил-тРНК^{Leu} в объеме 200 мкл содержала 100 мМ НЕРЕС, рН 7,5, 15 мМ MgCl₂, 2 мМ АТР, 1 мМ ДТТ, 40 мкг БСА, 30 мкМ изолейцин, 40 мкМ [¹⁴С]изолейцин (318 мКи/ммоль), 7 мкМ тРНК^{Leu} и 1,5 мкМ мутантную Лей-

РС D347A. Смесь инкубировали в течение 15 мин при $t = 60^\circ\text{C}$, реакцию останавливали добавлением равного объема фенола, насыщенного 0,2 М ацетатом натрия, рН 5,2, центрифугировали при 10000 об/мин и водную фазу осаждали тремя объемами этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия, рН 5,2. Осадок изолейцил-тРНК^{Leu} собирали центрифугированием, промывали 75 %-м этанолом, содержащим 5 мМ ацетат натрия, центрифугировали при 10000 об/мин и высушивали. Изолейцил-тРНК^{Leu} растворяли в 30 мкл 5 мМ ацетата натрия (рН 5,2) и хранили при $t = -30^\circ\text{C}$.

Деацилирование изолейцил-тРНК^{Leu} (посттрансферное редактирование). Реакцию проводили при $t = 20^\circ\text{C}$ в 20 мкл смеси, содержащей 100 мМ НЕРЕС, рН 7,0, 10 мМ MgCl₂, 2,5 мкМ изолейцил-тРНК^{Leu}, 0,2 мкМ ЛейРСТТ или ее мутант. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты (3 мкл) и наносили на бумажные фильтры Whatman 3ММ, предварительно обработанные 10 %-й ТХУ. Фильтры высушивали, промывали 3 раза 5 %-й ТХУ и один раз – этанолом, их радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике.

Изучение процесса общего (суммарного) редактирования по скорости образования [¹⁴С]АМР. Реакцию проводили при $t = 37^\circ\text{C}$ в реакционной смеси объемом 25 мкл, в состав которой входили 25 мМ НЕРЕС, рН 7,5, 25 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 4 мМ норвалин, 12 мкМ тРНК^{Leu} *T. thermophilus*, 80 мкМ [¹⁴С]АТР (50 мКи/ммоль), 1 мкМ ЛейРСТТ или ее мутант. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты (2 мкл) и наносили на пластины для тонкослойной хроматографии ПЕИ-целлюлозы, предварительно отмыемые водой и высушенные. В качестве маркера на каждую дорожку наносили 1 мкл 30 мМ смеси АТР, АДР и АМР. Хроматографию проводили в 0,75 М КН₂РO₄, рН 3,5. Пластины высушивали на воздухе, положение полос, соответствующих АТР, АДР и АМР, выявляли в ультрафиолете. Полоски вырезали и определяли их радиоактивность на сцинтилляционном счетчике в толуоловом сцинтилляторе.

Расчет K_d комплекса ЛейРСТТ–тРНК методом тушения флуоресценции триптофана. ЛейРСТТ титровали раствором тРНК, как описано в работе [13]. Раствор фермента (0,1 мкМ) в 100 мМ трис-

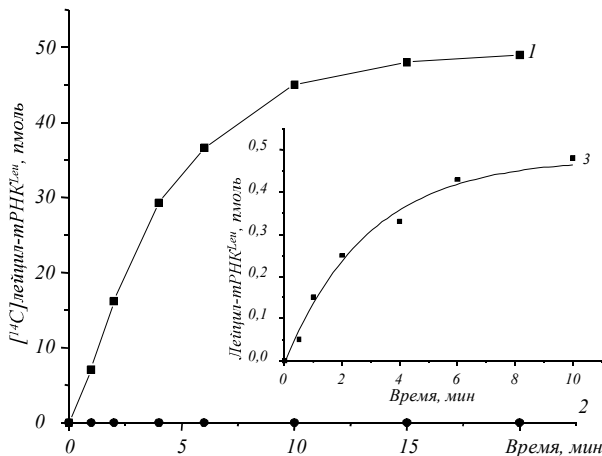


Рис. 2. Аминоацилирование тРНК^{Leu} ЛейРСТТ дикого типа (1) и мутантом ΔС (2, 3)

HCl, pH 7,8, 30 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 0,5 mM ДТТ титровали раствором тРНК^{Leu} *E. coli* в соответствующей концентрации при комнатной температуре. Флуоресценцию триптофана возбуждали при длине волны 280 нм, а эмиссию – при 340 нм. Значения K_d рассчитывали по кривой зависимости изменения интенсивности флуоресценции от концентрации тРНК^{Leu} *E. coli* с использованием программы Origin 7.5.

Вычисление кинетических параметров реакции аминоацилирования, катализируемой ЛейРСТТ и ЛейРС ΔС, для тРНК^{Leu} и тРНК^{Tyr}. Реакцию аминоацилирования проводили, как описано выше. Концентрацию тРНК варьировали от 0,1 до 10 мкМ (восемь значений). Реакцию инициировали добавлением фермента: концентрация ЛейРСТТ составляла 2 нМ, концентрация ЛейРС ΔС – 0,5 мкМ. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 мин при $t = 37$ °С, осаждали 100 мкл 10 %-й ТХУ и фильтровали через стеклянные фильтры GF/C. Фильтры высушивали и определяли их радиоактивность на сцинтилляционном счетчике. Кинетические параметры рассчитывали с использованием программы Enzfitter.

Результаты и обсуждение. В результате изучения структуры комплекса ЛейРСТТ с ее гомологичной тРНК установлено, что С-концевой домен фермента участвует во взаимодействии с тРНК [6]. Этот домен, состоящий из 60 а. о., связывается с углом L-формы тРНК^{Leu}. Так как на основании структурных данных выявлено только его взаимо-

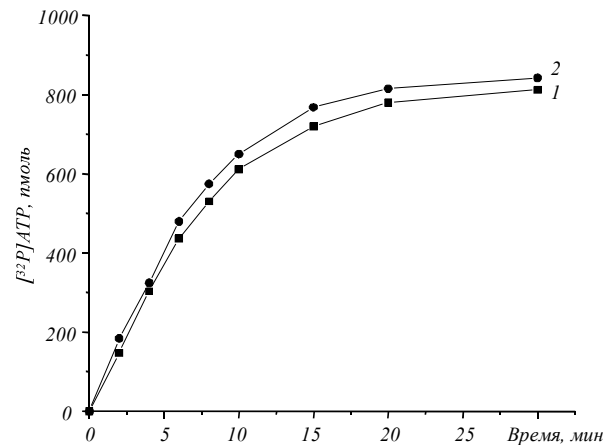


Рис. 3. Активность ЛейРСТТ дикого типа (1) и ΔС-мутанта (2) в реакции лейцин-зависимого АТР-РР₁-изотопного обмена

действие с консервативной третичной парой молекулы тРНК G19–C56, оставалось неясно, участвует ли он в обеспечении специфического узнавания тРНК. Анализ первичных структур С-домена ЛейРС из прокариотов, архей и эукариотов показал их значительное отличие, что может свидетельствовать о различной роли С-концевого домена в функционировании ЛейРС в зависимости от источника ее выделения.

Нами получен мутант ЛейРСТТ без С-концевого домена и определена его активность в реакциях активации аминокислоты и аминоацилирования тРНК. Как видно из рис. 2, делеция С-домена приводит к значительной потере активности фермента в реакции аминоацилирования, в то время как активация аминокислоты происходит практически с той же скоростью, что и для фермента дикого типа (рис. 3).

Кроме аминоацилирующей, ЛейРСТТ обладает еще и редактирующей активностью. Посттрансферную редактирующую активность выявляли, изучая гидролиз ошибочно аминоацилированной тРНК – изолейцил-тРНК^{Leu}. Установлено, что гидролитическая активность мутанта ΔС фактически полностью теряется (рис. 4). Таким образом, можно сделать вывод о том, что С-концевой домен играет ключевую роль в посттрансферной активности ЛейРСТТ. Наверное, этот домен важен для фиксации тРНК в ее посттрансферной конформации, что показано для кристаллической структуры комплекса ЛейРСТТ–тРНК [6].

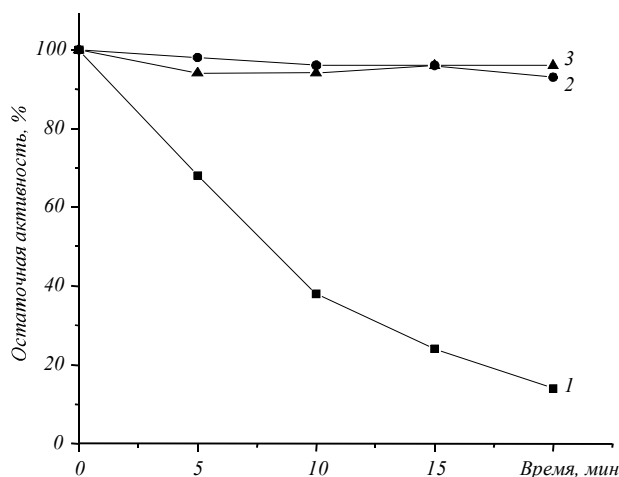


Рис. 4. Деацилирование изолейцил-тРНК^{Leu}: 1 – ЛейРСТТ дикого типа; 2 – ЛейРСТТ ΔС; 3 – в отсутствие фермента

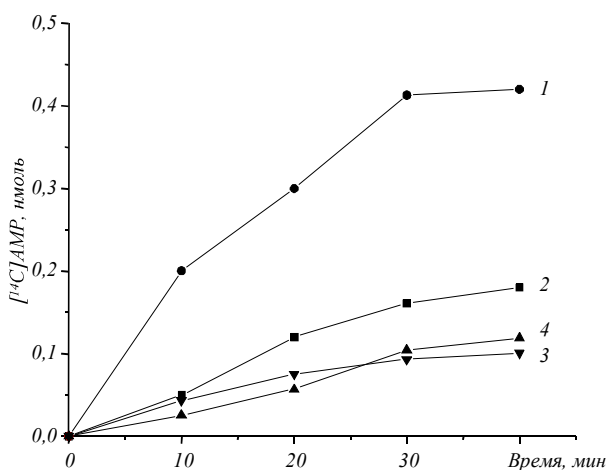


Рис. 5. Редактирование норвалина ЛейРСТТ: 1, 2 – ЛейРСТТ дикого типа в присутствии и в отсутствие тРНК^{Leu} соответственно; 3, 4 – то же для ЛейРСТТ ΔС

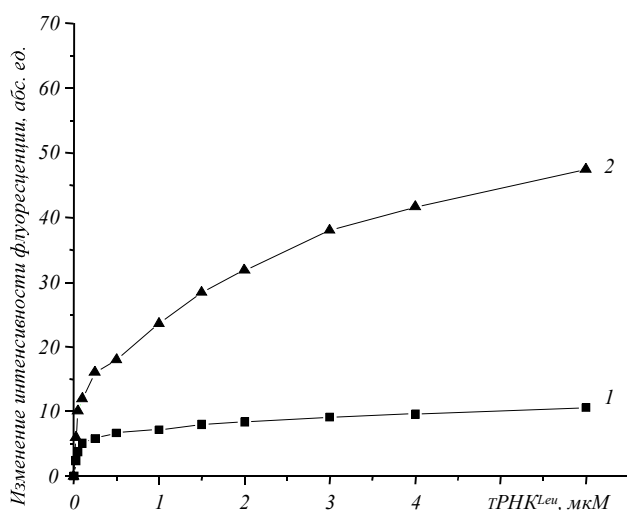


Рис. 6. Тушение собственной флуоресценции остатков триптофана ЛейРСТТ с помощью тРНК^{Leu}: 1 – ЛейРСТТ дикого типа ($K_d = 0,13$ мкМ); 2 – ЛейРСТТ ΔС ($K_d = 0,75$ мкМ)

Далее проверяли суммарную (пре- и пост-трансферная) редактирующую активность делетированного мутанта, измеряя уровень образования АМР в процессе реакции. Выявлено, что редактирующая активность мутанта ΔС значительно ниже, чем ЛейРСТТ дикого типа (рис. 5).

Вклад С-концевого домена во взаимодействие тРНК^{Leu} с ферментом оценивали, определяя величину K_d комплекса тРНК с ЛейРСТТ и ее мутантом ΔС методом флуоресцентного титрования. Для полноразмерного фермента получено значение K_d , равное 0,13 мкМ, что лежит в пределах значений, показанных для других тРНК-синтетазных взаимодействий. Титрование ΔС мутанта тРНК^{Leu} позволило установить величину K_d , составляющую 0,75 мкМ (рис. 6). Эти данные свидетельствуют о том, что С-домен ЛейРСТТ обеспечивает пятикратное увеличение аффинности связывания гомологичной тРНК с ферментом.

Специфическое связывание синтетазы с гомологичной тРНК зависит от элементов узнавания, находящихся на молекуле РНК. По данным рентгеноструктурного анализа комплекса ЛейРСТТ–тРНК^{Leu} С-домен взаимодействует с парой G19–C56, являющейся универсальной для всех тРНК. Поэтому интересно было проанализировать, как делеция С-концевого домена влияет на специфичность фермента. Для этого исследовали способность ЛейРСТТ и ее мутанта ΔС аминоацилировать тРНК^{Tyr} *E. coli*, которая, кроме пары G19–C56, содержит тот же дискриминаторный нуклеотид A73, что и тРНК^{Leu}. Следует отметить, что нуклеотид A73 является одним из основных элементов узнавания тРНК ЛейРС прокариотов [14, 15]. Определены также кинетические параметры обоих ферментов для тРНК^{Leu} и тРНК^{Tyr} (таблица). Как видно, делеция С-концевого домена приводит к незначительному колебанию величины K_m для тРНК^{Leu} и тРНК^{Tyr} в случае ЛейРСТТ дикого типа и ЛейРС ΔС (увеличивается в 2 и 4 раза соответственно), что лежит в пределах изменения K_d для тРНК, определенного нами методом флуоресцентного титрования. Факторы специфичности (k_{cat}/K_m тРНК^{Leu}/k_{cat}/K_m тРНК^{Tyr}) фермента дикого типа и ΔС-мутанта также отличаются незначительно (94 и 140 раз соответственно), что свидетельствует о не критичности С-домена для}}

Кинетические параметры реакции аминоацилирования, катализируемой ЛейРСТТ дикого типа и ЛейРСТТ ΔC , для тРНК^{Leu} и тРНК^{Tyr} *E. coli*

тРНК	K_m , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹
<i>ЛейРСТТ дикого типа</i>			
тРНК ^{Leu}	0,48 ± 0,02	0,91 ± 0,05	1,89
тРНК ^{Tyr}	24,7 ± 1,7	0,54 ± 0,03	0,022
<i>ЛейРСТТ ΔC</i>			
тРНК ^{Leu}	0,88 ± 0,09	0,006 ± 0,0005	0,007
тРНК ^{Tyr}	96 ± 12,7	0,0045 ± 0,001	0,00005

проявления специфичности фермента в узнавании гомологичной тРНК. Таким образом, как и предполагалось на основании данных по структуре комплекса ЛейРСТТ–тРНК^{Leu}, для выбора между гомологичной тРНК^{Leu} и тРНК^{Tyr} ЛейРСТТ использует различие в их пространственных структурах, взаимодействуя одновременно в нескольких местах с рибозо-фосфатным остовом тРНК, и эти контакты лежат за пределами взаимодействия с С-доменом.

В то же время обращает на себя внимание факт существенного влияния С-концевого домена на значение каталитической константы реакции аминоацилирования. Делеция последнего приводит к снижению k_{cat} в 152 раза (таблица). Следовательно, С-концевой домен ЛейРСТТ (а возможно, и других ЛейРС прокариотов) эволюционно приобретен для повышения скорости катализа в реакциях аминоацилирования и редактирования. На основании параметров K_m и k_{cat} , полученных при изучении кинетики стационарного состояния реакции аминоацилирования, сложно интерпретировать, на каком из этапов реакции (связывание субстратов, конформационные изменения, химическая реакция аминоацилирования, диссоциация продукта) С-домен наиболее важен. Для окончательного выяснения этого вопроса необходимо использовать методы кинетики переходного состояния, но результаты структурного анализа комплексов ЛейРСТТ–тРНК^{Leu} дают основание предположить важную роль С-концевого домена ЛейРСТТ. Сравнение полученных нами кристаллических структур комплекса ЛейРСТТ–тРНК^{Leu} с различными субстратами и в разных конформациях, а также результатов

молекулярного моделирования, позволило проследить динамику участия тРНК в ряде последовательных процессов, начиная от присоединения ее к ферменту, аминоацилирования, посттрансферного редактирования и высвобождения из комплекса [6, 16]. В процессе аминоацилирования и редактирования при фактически неизменной конформации основной части молекулы тРНК происходит передвижение ее 3'-конца из активного центра редактирующего домена в активный центр синтетического домена и наоборот. При этом наблюдаются существенные конформационные изменения фермента, связанные с движением СР1, лейцин-специфического домена и домена Zn-1. Перемещение последнего особенно критично, так как он перекрывает движение 3'-конца тРНК^{Leu} из аминоацилирующего центра в редактирующий. В то же время тРНК остается связанной с С-концевым доменом на всех перечисленных выше четырех этапах функционирования фермента. Таким образом, С-концевой домен играет существенную роль при фиксации тРНК в необходимой позиции в процессе аминоацилирования и посттрансферного редактирования ошибок. Интересно, что, как свидетельствуют структурные и полученные кинетические данные, необходимая фиксация С-концевого домена реализуется за счет относительно слабых взаимодействий: в контакте С-домена с тРНК участвуют всего несколько водородных связей и при его делеции обнаружено снижение значения K_d тРНК лишь в пять раз.

Для других АРСаз структурного класса 1a (ВалРС и ИлеРС *T. thermophilus*) также показано, что делеция С-концевого домена приводит к потере аминоацилирующей и посттрансферной редактирующей активности [17]. Однако в отличие от ЛейРСТТ, где отсутствие С-концевого домена в большей степени влияет на уменьшение каталитической константы аминоацилирования, в случае ВалРСТТ делеция соответствующего домена, кроме уменьшения k_{cat} (в 19 раз), вызывает также существенное увеличение K_m – в 28 раз [18]. Последнее указывает на важную роль С-концевого домена ВалРСТТ еще и в специфическом связывании гомологичной тРНК. В целом для АРСаз структурного класса 1a прокариотов С-концевой домен важен как для реакции аминоацилирования, так и пост-

трансферного редактирования. И хотя в деталях механизм его функционирования для АРСаз разной аминокислотной специфичности отличается, во всех трех системах перемещение 3'-конца тРНК из активного центра аминоацилирования в активный центр редактирования связан с преодолением стерических препятствий либо со стороны Zn-1-домена (для ЛейРС), либо со стороны β-тяжей, соединяющих СР1 домен с основной частью молекулы фермента (для ВалРС и ИлеРС). В случае ЛейРС архей, для которых показано, что С-концевой домен важен только для аминоацилирования и не влияет на посттрансферное редактирование, ориентация редактируемого домена отличается поворотом на 180° по сравнению с ВалРС и ИлеРС прокариотов [8]. Кроме того, домен Zn-1 не закрывает синтетического активного центра, как это наблюдается для ЛейРС прокариотов. Поэтому для ЛейРС архей, даже когда тРНК имеет меньше контактов с ферментом, что наблюдается при делеции С-концевого домена, ее 3'-конец беспрепятственно может быть позиционирован в активный центр редактирующего домена. Таким образом, наблюдаются вариации роли С-концевого домена ЛейРС из разных источников в процессе аминоацилирования и редактирования тРНК.

O. I. Gudzera, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Functional role of C-terminal domain of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

Aim. To study a role of C-terminal domain of *T. thermophilus* leucyl-tRNA synthetase (*LeuRSTT*) in the reactions of aminoacylation and editing. **Methods.** A mutant of *LeuRSTT* without C-terminal domain (ΔC) was obtained by the method of mutagenesis. The kinetic constants in aminoacylation reaction catalyzed by *LeuRS* and its mutant (ΔC) were determined by the methods of equilibrium enzyme kinetics. To evaluate the contribution of C-terminal domain to interaction of the enzyme with $tRNA^{Leu}$, K_d of a complex between tRNA and *LeuRSTT* and its mutant ΔC was determined by fluorescence titration. **Results.** The C-terminal domain is shown to play a significant role in the aminoacylation and editing reactions of *LeuRSTT* and not essential for the activity in the reaction of amino acid activation. The kinetic parameters of aminoacylation of $tRNA^{Leu}$ and $tRNA^{Tyr}$ by *LeuRS* and ΔC mutant were also determined, their analysis suggests that the C-domain is not critical for the manifestation of specificity of the enzyme in the recognition of homologous RNAs. At the same time a significant influence of the

C-terminal domain on the value of catalytic constant was shown. At the domain deletion the k_{cat} value is lower by 152-fold. **Conclusion.** The C-terminal domain of *LeuRSTT* is evolutionarily acquired to enhance the rate of catalysis in the aminoacylation and editing reactions, and makes no significant contribution to the specificity of the enzyme in the recognition of tRNA.

Keywords: leucyl-tRNA synthetase, $tRNA^{Leu}$, editing.

O. Й. Гудзера, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Функціональна роль С-кінцевого домену лейцил-тРНК синтетази *Thermus thermophilus*

Резюме

Мета. Дослідити роль С-кінцевого домену лейцил-тРНК синтетази *T. thermophilus* (*LeuRSTT*) у реакціях аміноацилювання та редагування. **Методи.** Мутант *LeuRSTT* без С-кінцевого домену (ΔC) отримано методом мутагенезу. Кінетичні константи в реакції аміноацилювання *LeuRS* та її мутанта ΔC визначали методами ферментативної кінетики стаціонарного стану. Для оцінювання внеску С-кінцевого домену у взаємодію ферменту з $tRNA^{Leu}$ методом флуоресцентного титрування розраховано K_d комплексу тРНК з *LeuRSTT* та її мутантом ΔC . **Результати.** Показано, що С-кінцевий домен відіграє істотну роль у реакціях аміноацилювання і редагування *LeuRSTT* і не є важливим для активності в реакції активації амінокислоти. Визначено також кінетичні параметри в реакції аміноацилювання *LeuRS* і ΔC мутанта для $tRNA^{Leu}$ і $tRNA^{Tyr}$, аналіз яких свідчить про те, що С-домен є некритичним для прояву специфічності ферменту у розпізнаванні гомологічної тРНК. У той же час встановлено суттєвий вплив С-кінцевого домену на величину каталітичної константи реакції аміноацилювання. Делеція останнього призводить до зниження k_{cat} у 152 рази. **Висновки.** С-кінцевий домен *LeuRSTT* еволюційно придбаний для підвищення швидкості каталізу в реакціях аміноацилювання і редагування і не робить значного внеску у забезпечення специфічності ферменту при розпізнаванні тРНК.

Ключові слова: лейцил-тРНК синтетаза, $tRNA^{Leu}$, редагування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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. Eriani G., Delarue M., Poch O., Gangloff J., Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs // *Nature*.—1990.—**347**, N 6289.—P. 203–206.
3. Cusack S. Eleven down and nine to go // *Nat. Struct. Biol.*—1995.—**2**, N 10.—P. 824–831.
4. Yaremchuk A., Cusack S., Gudzera O., Grotli M., Tukalo M. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Thermus thermophilus* leucyl-tRNA synthetase and its complexes with leucine and non-hydrolysable leucyl-adenylate analogue // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*—2000.—**56**, pt 5.—P. 667–669.
5. Cusack S., Yaremchuk A., Tukalo M. The 2 Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue // *EMBO J.*—2000.—**19**, N 10.—P. 2351–2361.
6. Tukalo M., Yaremchuk A., Fukunaga R., Yokoyama S., Cusack S. The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase com-

- plexed with tRNA^{Leu} in the post-transfer-editing conformation // *Nat. Struct. Mol. Biol.*—2005.—**12**, N 10.—P. 923–930.
7. Lincecum T. L. Jr., 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.
 8. Larkin D. C., Williams A. M., Martinis S. A., Fox G. E. Identification of essential domains of *Escherichia coli* tRNA^{Leu} aminoacylation and amino acid editing using minimalist RNA molecules // *Nucl. Acids Res.*—2002.—**30**, N 10.—P. 2103–2113.
 9. Fukunaga R., Yokoyama S. Crystal structure of leucyl-tRNA synthetase *Pyrococcus horikoshii* reveals a novel editing domain orientation // *J. Mol. Biol.*—2005.—**346**, N 1.—P. 57–71.
 10. Hsu J. L., Rho S. B., Vanella K. M., Martinis S. A. Functional divergence of a unique C-terminal domain of leucyl-tRNA synthetase to accommodate its splicing and aminoacylation roles // *J. Biol. Chem.*—2006.—**281**, N 32.—P. 23075–23082.
 11. Yaremchuk A. D., Gudzera O. I., Egorova S. P., Rozhko D. I., Krikliiviy I. A., Tukalo M. A. Leucyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. Purification and some properties of the crystallizing enzyme // *Biopolym. Cell.*—2001.—**17**, N 3.—P. 216–220.
 12. Krikliiviy I. A., Kovalenko O. P., Gudzera O. Y., Yaremchuk A. D., Tukalo M. A. Isolation and purification of *Thermus thermophilus* tRNA^{Leu} and determination of its modified nucleotides // *Biopolym. Cell.*—2008.—**24**, N 1.—P. 21–27.
 13. Tan M., Zhu B., Zhou X-L., He R., Chen X., Eriani G., Wang E. D. tRNA depended pre-transfer editing by prokaryotic leucyl-tRNA synthetase // *J. Biol. Chem.*—2010.—**285**, N 5.—P. 3235–3244.
 14. Giege R., Sissler M., Florentz C. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity // *Nucl. Acids Res.*—1998.—**26**, N 22.—P. 5017–5035.
 15. Hou Y. M. Discriminating among the discriminator bases of tRNAs // *Chem. Biol.*—1997.—**4**, N 1.—P. 93–96.
 16. Rock F. L., Mao W., Yaremchuk A., Tukalo M., Crepin N., Zhou H., Zhang Y. K., Hernandez V., Akama T., Baker S. J., Plattner J. J., Shapiro L., Martinis S. A., Benkovic S. J., Cusack S., Alley M. R. An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site // *Science.*—2007.—**316**, N 5832.—P. 1759–1761.
 17. Fukunaga R., Yokoyama S. The C-terminal domain of the archaeal leucyl-tRNA synthetase prevents misediting of isoleucyl-tRNA(Ile) // *Biochemistry.*—2007.—**46**, N 17.—P. 4985–4996.
 18. Fukai S., Nureki O., Sekine S., Shimada A., Tao J., Vassilyev D. G., Yokoyama S. Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA (Val) and valyl-tRNA synthetase // *Cell.*—2000.—**103**, N 5.—P. 793–803.

UDC 577.217.32
Received 10.09.10