



УДК 577.152.611*1.02 : 577.112.4

© 1991 г.

Д. В. Гнатенко, А. И. Корнелюк, Г. Х. Мацука

ТИРОЗИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗА ИЗ ПЕЧЕНИ БЫКА. ИЗУЧЕНИЕ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ОСТАТКОВ ГИСТИДИНА

Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев

Проведена специфическая химическая модификация остатков гистидина тирозил-тРНК-синтетазы (КФ 6.1.1.1) диэтилпирокарбонатом. В нативных условиях модификации подвергаются ~5 из 16 остатков гистидина на димер, причем модификация двух из них вызывает значительную инактивацию фермента на обеих стадиях катализируемой реакции аминоацилирования тРНК^{Тур}. Показано, что все субстраты в определенной мере защищают фермент от инактивации диэтилпирокарбонатом. Наибольшим защитным эффектом обладает АТР в присутствии тирозина, наименьшим — тРНК. Сделано предположение о существенной роли двух остатков гистидина на димер в катализе на обеих стадиях реакции аминоацилирования тРНК^{Тур}.

Аминоацил-тРНК-синтетазы взаимодействуют с тремя субстратами (аминокислота, АТР и тРНК), катализируя аминоацилирование конкретной тРНК с высокой специфичностью. Оптимум pH для обеих стадий реакции аминоацилирования находится в диапазоне pH 7—9. Известно, что в физиологическом интервале pH имидазольные кольца остатков гистидина могут либо оставаться незаряженными, либо присоединять ион H⁺ из раствора. Установлено, что остатки гистидина присутствуют в активных центрах многих ферментов. На основании рассмотрения химических свойств аминокислот, АТР и тРНК Краевским и др. [1] была выдвинута гипотеза, согласно которой активация карбоксильной группы аминокислоты может происходить посредством нуклеофильного катализа с участием имидазольных колец остатков гистидина.

В ряде работ показано, что остатки гистидина существенны для каталитического механизма некоторых аминоацил-тРНК-синтетаз. Описаны химические модификации диэтилпирокарбонатом (DEPC) остатков гистидина фенилаланил-тРНК-синтетазы из *Escherichia coli* [2] и дрожжей [3], триптофанил-тРНК-синтетазы из поджелудочной железы быка [4]. Для тирозил-тРНК-синтетазы из *Bacillus stearothermophilus* методами белковой инженерии показана существенная роль двух остатков гистидина (His-45 и His-48), которые вовлечены в формирование тирозиладенилата и, вероятно, в перенос остатка тирозина на тРНК^{Тур} [5, 6].

Ранее нами были выделены и охарактеризованы две формы тирозил-тРНК-синтетазы из печени быка [7]. Практически ничего не известно о функциональных группах этого фермента, участвующих в катализе. Целью данной работы было изучение функциональной роли остатков гистидина эукариотической тирозил-тРНК-синтетазы методом специфической химической модификации диэтилпирокарбонатом. Исследования проводили на функционально активной форме тирозил-тРНК-синтетазы, имеющей молекулярную массу 2×39 кДа. Аминокислотный анализ этой формы тирозил-тРНК-синтетазы свидетельствует о наличии 16 остатков His на димер фермента.

Модификация тирозил-тРНК-синтетазы в нативных условиях показала, что при концентрации DEPC 0,31 мМ ($P = 15$) увеличение поглощения при длине волны 240 нм заканчивается через 15 мин, а константа скорости реакции модификации составляет $0,19 \text{ мин}^{-1}$ (рис. 1). При этом модифицируется ~5 остатков гистидина на димер фермента. Дифференциаль-

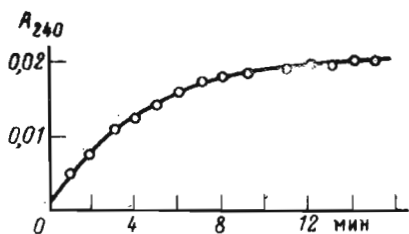


Рис. 1. Кинетика модификации тирозил-тРНК-синтетазы диэтилпирокрбонатом в нативных условиях, $P = 15$

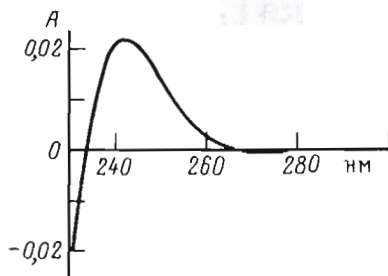


Рис. 2. Дифференциальный спектр поглощения тирозил-тРНК-синтетазы, модифицированной диэтилпирокрбонатом, $P = 15$

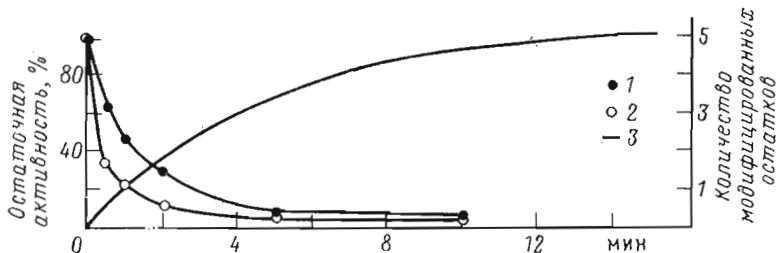


Рис. 3. Зависимость остаточной активности тирозил-тРНК-синтетазы в реакции АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена (1) и в реакции аминоацелирования тРНК^{Tyr} (2) от длительности инкубации с диэтилпирокрбонатом, $P = 15$; 3 — кинетика модификации остатков гистидина DEPC в расчете на димер фермента

ный спектр поглощения модифицированного фермента (рис. 2) не обнаруживает отрицательного поглощения в области 260—280 нм, что может свидетельствовать об отсутствии побочной реакции модификации остатков тирозина [8].

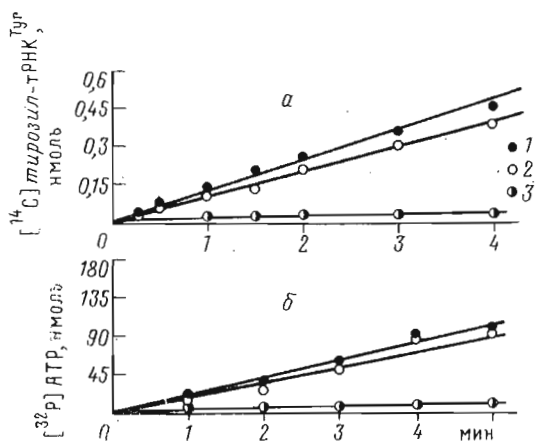
Исходя из того, что из 16 остатков гистидина при $P = 15$ модифицируются только 5 остатков на димер фермента, можно предположить, что их модификация не вызывает существенных конформационных перестроек тирозил-тРНК-синтетазы, которые бы изменили доступность остальных остатков гистидина модификатору.

Инкубация модифицированного таким образом фермента с гидроксиламином приводит к практически полному исчезновению поглощения в дифференциальном спектре поглощения фермента на длине волны 240 нм. Это свидетельствует о восстановлении модифицированных остатков гистидина и позволяет, по-видимому, исключить образование при $P = 15$ этоксикарбонильных производных гистидина, которые не могут восстанавливаться гидроксиламином [9].

Модификация бычьего сывороточного альбумина DEPC в нативных условиях при $P = 15$ показала, что при этом модифицируется $\sim 7,1$ остатка гистидина на мономер белка. Это согласуется с данными, полученными при модификации этого белка DEPC в работе [10], и может свидетельствовать об отсутствии образования диэтоксикарбонильных производных гистидина при значениях $P = 15$.

Инкубация тирозил-тРНК-синтетазы с DEPC при $P = 15$ приводит к инактивации фермента на обоих этапах катализируемой реакции (рис. 3). Модификация двух наиболее легко этоксикарбонилируемых остатков гистидина вызывает значительное снижение каталитической активности фермента. Наиболее резкая инактивация наблюдается в реакции аминоацелирования тРНК^{Tyr} (90%). В то же время инактивация фермента в реакции АТР — $[^{32}\text{P}]$ пирофосфатного обмена менее глубока и составляет 72%. Гель-электрофорез модифицированной тирозил-тРНК-синтетазы в нативных условиях показал отсутствие диссоциации фермента на субъединицы, чем можно было бы объяснить инактивацию тирозил-тРНК-синтетазы (данные не приводятся).

Рис. 4. Определение начальных скоростей реакции aminoацилирования тРНК^{Тур} (а) и АТР — [³²Р]пирофосфатного обмена (б) для тирозил-тРНК-синтетазы до модификации (1), после модификации фермента DEPC (P = 15, время инкубации 5 мин) (3) и после восстановления остатков гистидина гидроксиламином (2)



Восстановление же модифицированных DEPC остатков гистидина при инкубации с гидроксиламином приводило к восстановлению активности фермента на обеих стадиях катализируемой реакции (рис. 4). В реакции aminoацилирования тРНК^{Тур} активность восстанавливается на 80% от исходной, а в реакции АТР — [³²Р]пирофосфатного обмена — на 90%. Поскольку при этом практически исчезает поглощение на 240 нм для модифицированного фермента, можно предположить, что инактивация тирозил-тРНК-синтетазы DEPC обусловлена образованием моноэтоксикарбонильных производных наиболее реакционноспособных остатков гистидина. Инактивацию фермента нельзя, видимо, объяснить модификацией NH₂-групп, так как продукт модификации этих групп DEPC практически не может восстанавливаться гидроксиламином при данных условиях.

Эксперименты по изучению защитного влияния различных субстратов на скорость инактивации тирозил-тРНК-синтетазы DEPC на начальном отрезке кинетической кривой показали, что все субстраты в определенной степени защищают фермент от инактивации на обеих стадиях катализируемой реакции (таблица). Наибольшим защитным эффектом как в реакции АТР — [³²Р]пирофосфатного обмена, так и в реакции aminoацилирования тРНК^{Тур} обладает АТР и в большей степени АТР в присутствии тирозина. тРНК оказывает наименьшее защитное действие. По-видимому, два наиболее реакционноспособных остатка гистидина локализованы в активном центре тирозил-тРНК-синтетазы, и их модификация DEPC инактивирует фермент. Учитывая, что все субстраты в определенной степени защищают фермент от инактивации DEPC, можно предположить, что модифицируемые остатки гистидина эукариотической тирозил-тРНК-синтетазы существенны для каталитической функции фермента. Так как АТР в присутствии тирозина обладает большим защитным эффектом, чем эти же субстраты по отдельности, вероятно, что остатки гистидина вовлечены в формирование тирозиладенилата. С другой стороны, более глубокая инактивация фермента в реакции aminoацилирования тРНК^{Тур} может, по-видимому, свидетельствовать о том, что по крайней мере один остаток

Защитное влияние субстратов на инактивацию тирозил-тРНК-синтетазы при модификации диэтилпирокарбонатом на начальном участке кривой инактивации P = 15, время инкубации 2 мин

Субстрат	Концентрация, мМ	Кратность превышения K _m	Остаточная активность, %	
			АТР — [³² Р]пирофосфатный обмен	Aminoацилирование тРНК
—	—	—	28	9
Тирозин	1	20	71	73
Тирозин + АТР	1	20	98	82
АТР	5,4	15	95	72
тРНК	0,0021	3	57	52

гистидина существен для переноса тирозина на тРНК^{Тур}. Не исключено, что один или более остатков гистидина кроме катализа вовлечены в связывание субстратов, вероятно АТР или тирозина.

Экспериментальная часть

В работе применялись следующие реактивы: диэтилпирокарбонат (Serva, ФРГ), *L*-тирозин и *L*-гистидин (Sigma, США), K_2HPO_4 , КОН, NH_2OH , $MgCl_2$, NaF, ос. ч. (Союзреактив), АТР, норит А (Serva, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (Calbiochem, США), фильтры GF/C (Whatman, Великобритания). Остальные реактивы имели квалификацию х.ч. или ч.д.а.

Использованы меченые соединения: *L*- $[^{14}C]$ тирозин (уд. акт. 360 мКи/ммоль; UVVVR, ЧСФР) и $[^{32}P]$ пирофосфат аммония (уд. акт. 12 Ки/моль, «Изотоп», СССР).

Тирозил-тРНК-синтетазу из печени быка выделяли по модифицированной методике [7], включающей в себя осаждение белков при pH 5,0; хроматографию на DEAE-целлюлозе в трис-HCl-буфере, pH 7,9; хроматографию на фосфоцеллюлозе P-11 в калий-фосфатном буфере, pH 6,8; ВЭЖХ на колонке с гидрокспапатитом Bio-Gel HTPT в калий-фосфатном буфере, pH 6,8. Чистота полученного фермента, по данным гель-электрофореза в денатурирующих условиях [10], составила 93%. За единицу активности фермента принимали количество наномолей тРНК^{Тур}, аминокислотиримруемых 1 мг фермента за 1 мин при 37° С. Удельная активность тирозил-тРНК-синтетазы составила 98 единиц, кратность очистки по активности составила 5374 раза, выход 1,4%.

Суммарную тРНК из печени быка выделяли по методике Брунграбер [11] депротеинизацией гомогената ткани фенолом с последующей хроматографией на DEAE-целлюлозе в трис-HCl-буфере, pH 7,5. Содержание тРНК^{Тур} составило 1,5%.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [12], а также оценивали измерениями интенсивности собственной флуоресценции белка на длине волны 335 нм (в максимуме спектра флуоресценции тирозил-тРНК-синтетазы) при возбуждении на длине волны 280 нм. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi M 850.

Модификацию белка диэтилпирокарбонатом проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,0, при 20° С [13]. К раствору фермента добавляли соответствующее количество DEPC в абсолютном метаноле. Конечная концентрация метанола в пробе не превышала 2%. Кинетику модификации гистидиновых остатков регистрировали по величине абсорбции при 240 нм, отражающей образование *N*-этоксикарбонилгистидина и *N,N*-диэтоксикарбонилгистидина. Для расчета числа модифицированных остатков использовали величины молярных коэффициентов поглощения производных гистидина в зависимости от концентрации DEPC: 3200 М⁻¹·см⁻¹ при 1,15 мМ и менее и 5200 М⁻¹·см⁻¹ при 11,5 мМ [14]. Это дает возможность рассчитать количество модифицированных остатков гистидина без определения отдельно содержания моно- и дизамещенных производных [14].

Инкубацию модифицированного фермента с гидроксиламином (pH 7,0) осуществляли при некоторой вариации концентрации реагента и времени инкубации. Оптимальными оказались условия, соответствующие концентрации гидроксиламина 0,1 М, времени реакции 24 ч при 4° С. Контроль осуществляли по уменьшению поглощения при 240 нм и по восстановлению ферментативной активности.

Начальную скорость реакции аминокислотирования тРНК^{Тур} рассчитывали на линейном участке кинетической кривой. Инкубацию проводили в смеси объемом 400 мкл, содержащей 0,1 М трис-HCl (pH 8,0), 10 мМ АТР, нейтрализованной до pH 8,0, 20 мМ $MgCl_2$, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 3,7 мг/мл суммарной тРНК, 9 мкМ $[^{14}C]$ тирозин при 37° С. Через 1—3 мин периодически производили отбор проб по 20 мкл и наносили на бумажные фильтры FN-II, пропитанные 5% трихлоруксусной кислотой. Фильтры отмывали, сушили и определяли их ра-

диоактивность в сцинтилляционной жидкости ЖС-103 на счетчике SL-30 (Intertechnique, Франция), эффективность счета которого принимали равной 57%.

Начальную скорость реакции АТР — [32 P]пирофосфатного обмена рассчитывали на линейном участке кинетической кривой. Фермент инкубировали в смеси объемом 600 мкл, содержащей 0,1 М трис-НСl (рН 8,0), 2,5 мМ АТР, 10 мМ MgCl₂, 0,8 мМ тирозин, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 1 мМ пирофосфат натрия, 5—10 мкМ [32 P]пирофосфат аммония. Инкубацию проводили при 37° С в течение 5 мин, периодически отбирая аликвоты объемом 100 мкл. Аликвоты вносили в пробирки, содержащие 0,5 мл 0,2 М раствора пирофосфата натрия в 5% трихлоруксусной кислоте. Затем в пробирки вносили водную суспензию активированного угля Norit А до конечной концентрации последнего 1% и оставляли на 30 мин при 4° С. Осадки наносили на фильтры GF/C, отмывали 60 мл дистиллированной воды и закрепляли на фильтрах пропусканием 2 мл 2% раствора поливинилового спирта в воде. Радиоактивность фильтров определяли как описано выше.

Спектры абсорбции и дифференциальные спектры поглощения модифицированного фермента записывали на спектрофотометре Shimadzu 2100 в кюветках с длиной оптического пути 0,2 см. При построении графиков данные пересчитывали на длину оптического пути 1 см. Расчеты производили с использованием программного обеспечения вышеуказанного спектрофотометра.

Авторы глубоко признательны О. И. Лаврик (НИБХ СО АН СССР) за обсуждение результатов, ценные замечания и помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краевский А. А., Киселев Л. Л., Гомтх Б. П. // Молекулярн. биология. 1973. Т. 7. № 5. С. 769—775.
2. Hennecke H., Böck A. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 50. № 1. P. 157—166.
3. Raffin J.-P., Remy P. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 520. № 1. P. 164—174.
4. Favorova O. O., Madoyan I. A., Kisselev L. L. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 86. № 1. P. 193—202.
5. Lowe M. D., Winter G., Fersht A. R. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 19. P. 6038—6043.
6. Laetherbarrow R. J., Fersht A. R., Winter G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 23. P. 7840—7844.
7. Корнелюк А. И., Курочкин И. В., Мацука Г. Х. // Молекулярн. биология. 1988. Т. 22. № 1. С. 176—186.
8. Burstein Y., Walsh K., Neurath H. // Biochemistry. 1974. V. 13. № 1. P. 205—210.
9. Агаева С. М., Краснова В. И. // Биоорган. химия. 1975. Т. 1. № 11. С. 1600—1606.
10. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
11. Brungraber E. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1962. V. 8. № 1. P. 1—3.
12. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.
13. Kumagai H., Utagawa T., Yamada H. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 5. P. 1661—1668.
14. Rosemont J. L. // Anal. Biochem. 1978. V. 88. № 5. P. 314—320.

Поступила в редакцию
3.I.1991

После доработки
10.III.1991

D. V. GNATENKO, A. I. KORNELYUK, G. Kh. MATSUKA

TYROSYL-tRNA SYNTHETASE FROM BOVINE LIVER: STUDY OF THE FUNCTIONAL ROLE OF HISTIDYL RESIDUES

Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

A specific chemical modification of histidyl residues in tyrosyl-tRNA synthetase by diethyl pyrocarbonate was performed. It is shown that five of sixteen histidyl residues can react with diethyl pyrocarbonate in the native conditions. Modification of two histidyl residues per dimer results in the inactivation of tyrosyl-tRNA synthetase in both steps of the tRNA^{Tyr} aminoacylation. All substrates protect tyrosyl-tRNA synthetase against inactivation with diethyl pyrocarbonate, the most effective protector being combination of ATP and tyrosine. Histidyl residues of tyrosyl-tRNA synthetase are suggested to be involved in the catalytic mechanism of aminoacylation of tRNA^{Tyr}.