



УДК 577.159.08

**КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ТРИПТОФАНИЛ-тРНК-СИНТЕАЗЫ
ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЫКА***Черная М. М., Нурбеков М. К., Фаворова О. О.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Получены кристаллы бычьей триптофанил-тРНК-синтеазы; это первая закристаллизованная аминоацил-тРНК-синтеза из многоклеточного организма. Кристаллы фермента выращивались 2–3 недели из растворов сульфата лития при pH 7,4 методом диффузии паров в висящей капле (размеры кристаллов $0,15-0,2 \times 0,09 \times 0,05$ мм). Для ускорения процесса был использован метод кристаллизации в ультрацентрифуге, позволивший за 48 ч получить более крупные кристаллы ($0,8 \times 0,15 \times 0,1$ мм). Для полученных кристаллов приводятся предварительные рентгеноструктурные данные.

Аминоацил-тРНК-синтеазы (КФ 6.1.1) катализируют строго избирательное присоединение аминокислот к соответствующим тРНК, обеспечивая правильность трансляции. Для понимания механизма функционирования аминоацил-тРНК-синтеаз, в том числе специфического узнавания белка и нуклеиновой кислоты, необходимо знание их трехмерных структур. В настоящее время методом рентгеноструктурного анализа исследуются некоторые аминоацил-тРНК-синтеазы [1–4] и тРНК [5–7] из одноклеточных организмов. Поскольку обнаружены различия в структуре и особенностях функционирования как между ферментами, специфичными к разным аминокислотам, так и между синтезазами, выделенными из различных организмов [8, 9], но обладающими одинаковой специфичностью, исследование структуры и функции каждой новой аминоацил-тРНК-синтеазы представляет несомненный интерес.

Основной трудностью рентгеноструктурного анализа белков является получение крупных, хорошо рассеивающих рентгеновские лучи кристаллов. В настоящее время только несколько аминоацил-тРНК-синтеаз, выделенных из одноклеточных организмов (бактерий или дрожжей), получено в кристаллическом виде [10–16], причем многие из них непригодны для полного рентгеноструктурного анализа из-за недостаточных размеров или радиационной нестабильности кристаллов [13, 14, 16].

В настоящей работе в качестве перспективного объекта для кристаллизации и последующего рентгеноструктурного анализа была выбрана триптофанил-тРНК-синтеаза из поджелудочной железы быка (α_2 -тип, 120 кД). Разработан метод выделения данного фермента в гомогенном состоянии с высоким выходом и достаточно подробно исследованы его свойства [17].

Для подбора условий кристаллизации триптофанил-тРНК-синтеазы использовали в качестве основного метод диффузии паров в висящей капле [18], требующий всего 100–200 мкг белка на один опыт. Кристал-

Длины кристаллов триптофанил-тРНК-синтетазы (мкм), полученных в висящей капле под действием сульфата лития

Концентрация белка, мг/мл	Концентрация осадителя в резервуаре, М						
	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2	2,4
6	—	—	—	—	20	15	10
7,5	—	—	—	—	50	35	10
10	—	100	70	35	20	15	10
20	180	180	150	100	50	15	10
40	200	180	150	50	20	10	5

Примечание. Исходный раствор белка, содержащий 0,7 М Li_2SO_4 , уравнивали при 20° С против растворов Li_2SO_4 указанных концентраций. В каплях вырастали кристаллы через 2—3 недели. Отношение длины кристалла к его ширине и толщине ~ 4 : 2 : 1.

лы удалось получить из растворов как сульфата аммония, так и сульфата лития при значениях pH 7,2—7,4 и температуре от 4 до 20° С. Размеры кристаллов увеличивались при увеличении концентрации белка и одновременно уменьшении концентрации осадителя (таблица), причем в случае сульфата лития кристаллы были в 3—7 раз больше, чем в случае сульфата аммония, и имели форму шестигранных призм с пирамидальными концами (рисунок).

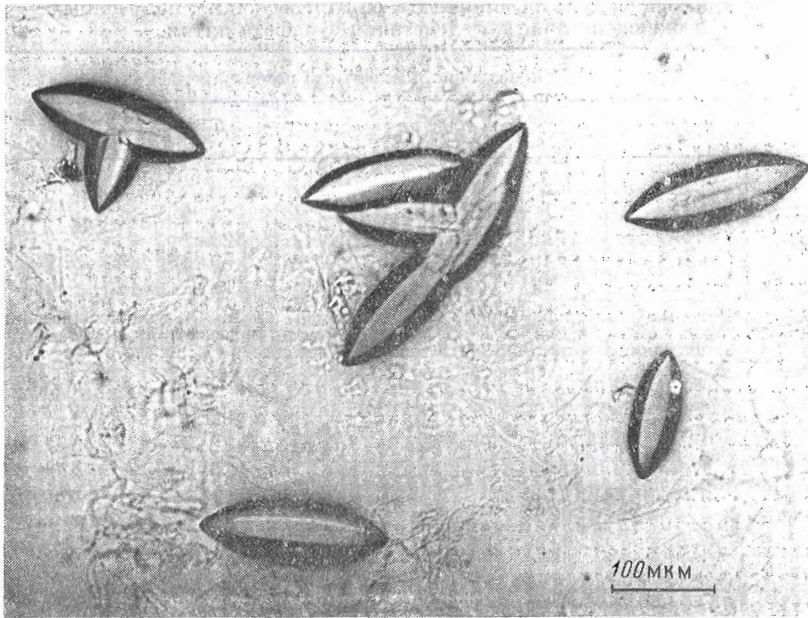
В процессе кристаллизации в растворе были обнаружены продукты ограниченного эндогенного протеолиза белка (51, 40 и 24 кД), [19] вследствие присутствия следовых количеств протеаз. Поэтому в дальнейшем все опыты по кристаллизации триптофанил-тРНК-синтетазы вели в присутствии 0,1 мМ динизопропилфторфосфата — мощного ингибитора протеаз. Другой путь, предотвращающий влияние протеолиза на результат кристаллизации, заключался в сокращении ее длительности до 1—2 сут благодаря использованию метода ультрацентрифугирования [20]. Многие препараты триптофанил-тРНК-синтетазы, которые при других методах кристаллизации давали микрокристаллы до 5—10 мк, в ультрацентрифуге образовывали кристаллы до 0,3 мм в длину. Они обычно имели правильную огранку, их форма не отличалась от формы кристаллов, полученных методом диффузии паров.

В молекуле триптофанил-тРНК-синтетазы был обнаружен существенный для активности цинк, удаление которого приводит к обратимой инаktivации фермента и изменению спектров кругового дихроизма в ближней ультрафиолетовой области [21, 22]. При выделении фермента по обычной схеме (в присутствии 0,1 мМ EDTA) часть ионов Zn^{2+} терялась. Известно, что потеря кофактора при выделении белков часто приводит к ухудшению способности кристаллизоваться [23]. Добавление цинка в концентрации 10^{-6} М благоприятно сказалось на кристаллизации триптофанил-тРНК-синтетазы; уменьшилось количество гелеобразного материала, который обычно присутствовал при кристаллизации в центрифуге.

Наиболее крупные (0,8×0,15×0,01 мм) кристаллы были получены в ультрацентрифуге при концентрациях белка 0,4—0,6 мг/мл и сульфата лития 0,3—0,5 М, скорости вращения ротора 25 000 об/мин, температуре 16° С, времени центрифугирования 48 ч.

По прецессионным рентгенограммам (угол прецессии 4°), полученным с этих кристаллов, были определены параметры гексагональной ячейки: a , b 132 ± 1 Å, c 125 ± 1 Å. Однако качество прецессионных рентгенограмм не позволило однозначно установить пространственную группу этих кристаллов; кристаллическая решетка разрушалась после 8 ч облучения.

Разработанная методика кристаллизации позволяет надеяться на получение более крупных и качественных кристаллов триптофанил-тРНК-синтетазы.



Кристаллы триптофанил-тРНК-синтетазы, выращенные в висящей капле методом диффузии паров. Концентрация белка 20 мг/мл, Li_2SO_4 — 1,4 М

Экспериментальная часть

Препарат триптофанил-тРНК-синтетазы получали из поджелудочной железы быка по методике [17], используя для концентрирования белка вместо высаливания сульфатом аммония метод ультрафильтрации при ионной силе 0,3 М. Для дополнительной очистки препаратов триптофанил-тРНК-синтетазы от следов протеаз использовали рехроматографию на колонках с DEAE-целлюлозой или сефадексом G-100, а также колоночную хроматографию на сефарозе 4В методом обратной экстракции [24] и аффинную хроматографию на сефарозе 4В, содержащей ковалентно присоединенный соевый ингибитор трипсина [25].

Кристаллизация триптофанил-тРНК-синтетазы методом диффузии паров в висящей капле. Раствор белка диализовали 1 сут при 4°C относительно противораствора 50 мМ трис-НСl, pH 7,4, содержащего 2 мМ дитиотреит, 0,5 мМ *L*-триптофан, 5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ диизопропилфторфосфат и 0,7 М Li_2SO_4 , затем центрифугировали 20 мин при 15 000 об/мин. По 10 мкм этого раствора наносили на покровное стеклышко и герметично закрывали им резервуар, содержащий 1 мл раствора Li_2SO_4 различной концентрации в том же буфере. Систему оставляли уравниваться при 4 или 20°C .

Кристаллизация триптофанил-тРНК-синтетазы в ультрацентрифуге. Раствор белка с концентрацией 0,1–0,6 мг/мл в 50 мМ трис-НСl, pH 7,4, содержащем 1 мМ дитиотреит, 5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ *L*-триптофан, 10^{-6} М ZnSO_4 , 0,1 мМ диизопропилфторфосфат, 0,3–0,9 М Li_2SO_4 , фильтровали для освобождения от механических примесей через фильтр (Millipore) с диаметром пор 0,45 мкм. Затем порции этого раствора по 10 мкл центрифугировали 48 ч в нитроцеллюлозных стаканчиках со скоростью 25 000 об/мин при 16 – 18°C . Кристаллы хранили в маточном растворе, содержащем 1,4 М сульфат лития.

Авторы выражают благодарность проф. Н. С. Андреевой и проф. Л. Л. Киселеву за постоянный интерес и обсуждение результатов работы, а также М. Г. Сафро и А. И. Горюнову за проведение рентгеновской съемки кристаллов фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zelwer C., Risler J. L., Monteilhet C.* A low-resolution model of crystalline methionyl-transfer RNA synthetase from *Escherichia coli*.—*J. Mol. Biol.*, 1976, v. 102, № 1, p. 93–101.
2. *Risler J. L., Zelwer C., Brunie S.* The crystal structure of methionyl-tRNA synthetase from *E. coli*.— In: EMBO-FEBS workshop on tRNA structure and function. Abstracts. Strasbourg, France, 1980.
3. *Irwin M. J., Nyborg J., Reid B. R., Blow D. M.* The crystal structure of tyrosyl-tRNA synthetase at 2,7 Å resolution.—*J. Mol. Biol.*, 1976, v. 105, № 4, p. 577–586.
4. *Bhat T. N., Blow D. M., Brick P., Monteilhet C., Nyborg J.* A reinterpretation of polypeptide chain conformation in tyrosyl-tRNA synthetase.— In: EMBO-FEBS workshop on tRNA structure and function. Abstracts. Strasbourg, France, 1980.
5. *Rich A., RajBhandary U. L.* Transfer RNA: molecular structure, sequence and properties.—*Ann. Rev. Biochem.*, 1976, v. 45, p. 805–860.
6. *Moras D., Comarmond M. B., Fisher J., Weiss R., Thierry J. C., Giege R., Dietrich A., Ebel J. P.* Structural studies on tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase in the yeast aspartic acid system.— In: EMBO-FEBS workshop on tRNA structure and function. Abstracts. Strasbourg, France, 1980.
7. *Woo N. H., Roe B. A., Rich A.* Crystal structure of *E. coli* tRNA^{Met}: conformation of initiator transfer RNA molecules.— In: EMBO-FEBS workshop on tRNA structure and function. Abstracts. Strasbourg, France, 1980.
8. *Kisselev L. L., Favorova O. O.* Aminoacyl-tRNA synthetases; some recent results and achievements.—*Adv. Enzymol.*, 1974, v. 40, p. 141–238.
9. *Schimmel P. R., Söll D.* Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs.—*Ann. Rev. Biochem.*, 1979, v. 48, p. 601–648.
10. *Reid B. R., Koch G. L. E., Boulanger Y., Hartley B. S., Blow D. M.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on tyrosyl-transfer RNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*.—*J. Mol. Biol.*, 1973, v. 80, № 1, p. 199–201.
11. *Waller J. P., Risler J. L., Monteilhet C., Zelwer C.* Crystallization of trypsin-modified methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*.—*FEBS Lett.*, 1971, v. 16, № 3, p. 186–188.
12. *Chirickjan J. C., Wright H. T., Fresco J. R.* Crystallization of tRNA^{Leu}-synthetase from Baker's yeast.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, v. 69, № 6, p. 1638–1641.
13. *Lagerkvist U., Rymo L., Linquist O., Anderson E.* Some properties of crystals of lysine transfer ribonucleic acid ligase from yeast.—*J. Mol. Biol.*, 1972, v. 247, № 12, p. 3897–3899.
14. *Paradies H. H.* Isolation and crystallization of valyl-tRNA synthetase from *E. coli* MRE 600.—*J. Biochem.*, 1974, v. 76, № 3, p. 655–659.
15. *Dietrich A., Giege R., Comarmond M. B., Thierry J. C., Moras D.* Crystallographic studies on the aspartyl-tRNA synthetase-tRNA^{Asp} system from yeast. The crystalline aminoacyl-tRNA synthetase.—*J. Mol. Biol.*, 1980, v. 138, № 1, p. 129–135.
16. *Carter C. W., Carter C. W.* Protein crystallization using incomplete factorial experiments.—*J. Biol. Chem.*, 1979, v. 254, № 23, p. 12219–12223.
17. *Фаворова О. О., Кочкина Л. Л., Шайго М., Нарин А. В., Хильно С. И., Прасолов В. С., Киселев Л. Л.* Триптофанил-тРНК-синтетазы. Выделение и характеристика двух форм фермента.—*Молекулярн. биол.*, 1974, т. 8, вып. 5, с. 729–740.
18. *Wlodawer A., Hodgson K. O.* Crystallization and crystal data of monellin.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, № 1, p. 398–399.
19. *Прасолов В. С., Фаворова О. О., Киселев Л. Л.* Модифицированные функционально активные формы триптофанил-тРНК-синтетазы, полученные с помощью эндогенного ограниченного протеолиза.—*Биоорг. химия*, 1975, т. 1, № 8, с. 1162–1168.
20. *Карпухина С. Я., Барынин В. В., Лобанова Г. М.* Кристаллизация каталазы в ультрацентрифуге.—*Кристаллография*, 1975, т. 20, вып. 3, с. 680–681.
21. *Нурбеков М. К., Фаворова О. О., Дмитриенко С. Г., Бологина И. А., Киселев Л. Л.* Роль ионов цинка в функционировании бычьей триптофанил-тРНК-синтетазы.—*Молекулярн. биол.*, 1981, т. 15, № 5, с. 1000–1010.
22. *Нурбеков М. К., Бологина И. А., Лугаускас В. Ю., Фаворова О. О.* Структура триптофанил-тРНК-синтетазы и продуктов ее ограниченного протеолиза по данным кругового дихроизма.—*Докл. АН СССР*, 1980, т. 255, № 2, с. 482–486.
23. *Бланделл Т., Джонсон Л.* Кристаллография белка. М.: Мир, 1979, с. 18.
24. *von der Haar F.* Purification of proteins by fractional interfacial salting out on unsubstituted agarose gels.—*Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 70, № 3, p. 1009–1013.
25. *Liepnicks J. J., Light A.* Preparation of β-trypsin by affinity chromatography of enterokinase-activated bovine trypsinogen.—*Anal. Biochem.*, 1974, v. 60, № 2, p. 395–404.

Поступила в редакцию
23.III.1981

После доработки
3.VI.1981

CRYSTALLIZATION OF TRYPTOPHANYL-tRNA SYNTHETASE
FROM BEAF PANCREAS

CHERNAYA M. M., NURBEKOV M. K., FAVOROVA O. O.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The crystals of tryptophanyl-tRNA synthetase from beaf pancreas were obtained, this being a first case of crystalizing the aminoacyl-tRNA synthetase from a multicellular organism. Crystallizations was carried out from lithium sulphate solution at pH 7.4 by vapor diffusion during 2-3 weeks, and gave the crystals of 0,15-0,2×0,09×0,05 mm dimensions. Using crystallization in an ultracentrifuge, larger crystals — 0,8×0,15×0,1 mm were grown in 48 hours. The preliminary crystallographic data are given for these crystals.