

В.М. Засць, Л.А. Коломієць, О.Ю. Цуварєв, О.І. Корнелюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка

Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна,

тел.: +38 (044) 526 55 89, e-mail: v.n.zayets@gmail.com

ВИДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗ СТРУКТУРИ МУТАНТНОЇ ФОРМИ N-КІНЦЕВОГО КАТАЛІТИЧНОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ *BOS TAURUS* З ЗАМІНОЮ Trp 40 ТА Trp 87 НА АЛАНІН

Мета. Виділення та аналіз структури мутантного одотриптофанового білка міні *BtTyrRS* для дослідження за допомогою методів флуоресцентної спектроскопії конформаційних змін фермента в процесі взаємодії з антикодоном тРНК та визначення впливу залишків триптофану в положенні 40 та 87 в його структурі на функціональні властивості ензиму. **Методи.** Електрофорез, метал-хелатувальна афінна хроматографія, флуоресцентна спектроскопія, моделювання просторової структури. **Результати.** Встановлено, що заміна двох кодонів амінокислоти триптофану на кодони амінокислоти аланіну в клонованій кДНК міні *BtTyrRS* не впливає на синтез мутантної форми фермента в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Вихід афінно очищеного на Ni-NTA агарозі білка складає в середньому 3,5 мг з 100 мл культурального середовища. Комп'ютерне моделювання структури та флуоресцентна спектроскопія одотриптофанової форми міні *BtTyrRS* вказують на компактну структуру мутантного фермента, в якому Trp 283 знаходиться в іммобілізованому мікрооточенні. **Висновки.** Отримано афінно очищений на Ni-NTA агарозі мутантний одотриптофановий білок міні *TyrRS*, придатний для флуоресцентних досліджень структурно-динамічних та функціональних властивостей ензиму.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, мутанта форма міні *TyrRS*, бактеріальна експресія.

Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) [КФ 6.1.1] є ключовим ферментом першого етапу білкового синтезу. АРСази каталізують високоселективну АТФ-залежну активацію амінокислоти з утворенням аміноациладенілата та ковалентне приєднання її до ізоакцепторної тРНК, здійснюючи таким чином першу стадію реалізації закодованої в геномі організмів інформації про структуру білка [1].

Тирозил-тРНК синтетаза (*TyrRS*) є однією з найбільш вивчених АРСаз. В клітинах ссавців вона є гомодимером $\alpha 2$ типу, мономером якого є повнорозмірний фермент. Мономер *TyrRS* *Bos taurus* (59.2 кДа) складається з N-кінцевого каталітичного (міні *BtTyrRS*, 39 кДа) та C-кінцевого ЕМАР II-подібного (20кДа) модулів [2]. В *BtTyrRS* N-кінцевому модулю притаманна каталітична



функція аміноацилювання тРНК, тоді як С-модуль відповідає за корегування та стабілізацію розміщення тРНК в активному центрі фермента [2,3]. Крім основної функції аміноацилювання тРНК тирозил-тРНК синтетаза виконує в клітині і важливі неканонічні функції. Після розщеплення синтетази еластазою на міні *BtTyrRS* та С-модуль, останні проявляють цитокінові властивості: міні *TyrRS* є інтерлейкін-подібним цитокіном і стимулює ангиогенез, активує міграцію ендотеліальних клітин, а також є хемотаксичним фактором для нейтрофілів, тоді як С-модуль є ЕМАР II подібним цитокіном і стимулює хемотаксичну активність моноцитів та підсилює прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин [3,4].

З огляду на те, що N-кінцевий каталітичний модуль синтетази є інтерлейкін-подібним цитокіном і проявляє проангіогенні властивості, він є перспективним об'єктом для досліджень з метою можливого використання в подальшому як лікарського препарату.

Амінокислотна послідовність N-кінцевого каталітичного модуля тирозил- тРНК синтетази *Bos taurus* має три залишки триптофану, які в структурі білка розташовані в активному центрі ферменту (W40), в області димеризації мономерів міні *BtTyrRS* (W87) та в сайті зв'язування триплету антикодону тРНК *TyrRS* (W283). Розташування залишків триптофану в функціонально важливих областях ензиму робить перспективним дослідження його властивостей методами флуоресцентної спектроскопії, оскільки флуоресцентна спектроскопія є одним з найбільш інформативних методів вивчення конформаційних особливостей і внутрішньомолекулярних взаємодій в структурі білків [5]. Найбільш інформативними флуоресцентні дослідження властивостей білків стають при наявності лише одного залишка триптофану в їх структурі.

Раніше нами було клоновано кДНК каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази в експресуючій плазміді рЕТ32а та досліджено його експресію [6]. В подальшому за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу в клонованій кДНК міні *BtTyrRS* було заміщено кодони Trp40 та Trp87 на кодони аланіну і залишено лише один кодон триптофану в області зв'язування ферментом антикодону [7].

Метою даної роботи було виділення та аналіз структури мутантного однотриптофанового білка міні *BtTyrRS* для дослідження в подальшому за допомогою методів флуоресцентної спектроскопії конформаційних змін фермента в процесі взаємодії з антикодоном тРНК та визначення впливу залишків триптофану в положенні 40 та 87 в його структурі на функціональні властивості ензиму.

Матеріали і методи

В роботі була використана бактеріальна система *E. coli*, оскільки експресія білків в *E. coli* є недорогим, простим і швидким методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у великих кількостях в нативному стані [8,9]. Для отримання мутантної форми міні *TyrRS* було взято штам-продуцент рекомбінантного білка *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* (Stratagene, США), трансформований плазмідною конструкцією рЕТ30а-39KYRSW283. Експресуюча конструкція рЕТ30а-39KYRSW283 була створена на базі вектору рЕТ-30а(+)



(“Novagen”, США) і містила клоновану мутантну по кодонам триптофанів в положенні 40 та 87 кДНК міні *BtTyrRS*.

Для напрацювання рекомбінантної плазмиди pET30a-39KYRSW283 використовували генноінженерний штам *E. coli* DH5 α . Плазмідну ДНК виділяли за допомогою кіта Gene JET Plasmid Miniprep Kit фірми “Thermo Scientific”. Концентрацію плазмідної ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”). Компетентні клітини *E. coli* отримували згідно методу Іное [10]. Всі процедури з трансформації плазмідної конструкції pET30a-39KYRSW283 в компетентні клітини *E. coli* проводили стандартним методом згідно з лабораторним посібником [11].

Вирощування культури *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* та індукцію експресії рекомбінантної міні *BtTyrRS* в бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бергані (LB) (10 г бактотриптон, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl на 1 л) з 30 мкг/мл антибіотика канаміцину. Трансформовані рекомбінантною плазмідною pET30a-39KYRSW283 компетентні клітини *E. coli* вирощували на шейкері (Environmental Shaker Incubator ES-20) при 37 °C до оптичної густини A600 = 0,6–0,8 і індукували синтез цільового білка додаванням 1М ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозиду (IPTG) до 1мМ концентрації з наступною інкубацією при 25 °C впродовж 12 годин згідно статті [12]. Зібрану біомасу зі 100 мл культури ресуспендували у 12 мл буферу для лізису клітин (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Лізис проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗ-озвучуванням (6 циклів по 20 с, інтервали 20 с). Лізат освітлювали центрифугуванням при 13000 об/хв протягом 30 хв при 4 °C. Супернатант наносили на врівноважену буфером для лізису клітин Ni-NTA агарозну колонку об’ємом 2 мл, яку промивали 10 мл буферу для промивки (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Рекомбінантний білок елюювали 5 мл буферу для елюції (50 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Фракції з елююваним білком об’єднували і діалізували проти 300 мл буферу для діалізу (500 мМ натрій-фосфатний буфер рН 8,0, 150 мМ NaCl) впродовж 20 годин при + 4 °C.

Концентрацію очищеного рекомбінантного білка міні *BtTyrRS* визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі BioMate 5, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції 27850 M⁻¹ cm⁻¹ при довжині хвилі 280 нм. Коефіцієнт оптичного поглинання визначали за даними амінокислотного складу білка за допомогою програми ProtParam (<http://expasy.ch/cgi-bin/protparam>).

Електрофоретичний аналіз експресії рекомбінантного білка проводили за допомогою електрофорезу в 12% поліакриламідному гелі в денатурувальних умовах в буферній системі Леммлі [13]. Гелі забарвлювали барвником Cumassie R250.

Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі з термостатованим кюветотримачем Hitachi M850 (Японія). Температуру у кюветі визначали з точністю до + 0,2 °C. Вимірювання проводили у кварцевій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілини для монохроматора збуджувального світла та реєструючої системи становила 5–10 нм.



Довжина хвилі збуджувального світла дорівнювала 280 нм та 295 нм, інтервал довжини хвиль для спектрів флюоресценції становив 300–400 нм, реєстрацію флюоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджувального світла при температурі 25 °С.

Амінокислотна послідовність TyrRS *Bos taurus* була взята з бази даних NCBI Gene data-base (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) за ідентифікаційним номером DAA32266.1. Просторові структури димера подвійного мутанта *Bt*TyrRS були змодельовані з кристалічної структури *Hs*TyrRS (коди PDB 1N3L:A) як матриці за допомогою веб-сервера SWISS-MODEL [14].

Результати та їх обговорення

В попередніх роботах нами була отримана, клонована в низці плазмідних векторів та секвенована повна нуклеотидна послідовність кДНК гену тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* [15]. На її основі була створена експресуюча конструкція рЕТ-30a(+)-39KYRS з клонованою послідовністю кДНК N-кінцевого каталітичного модуля синтетази. Експресований в штамі *E. coli* BL21 (DE3) рекомбінантний білок міні *Bt*TyrRS зберігав аміноацилювальну здатність, притаманну аміноацил-тРНК синтетази.

Базуючись на рентгенструктурних даних кристалів N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази людини [16], яка на 95% схожа з міні TyrRS *Bos taurus*, і комп'ютерній моделі просторової структури повнорозмірної тирозил-тРНК-синтетази *Bos taurus* [17], нами була побудована комп'ютерна модель структурної організації гомодимера N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS *Bos taurus* [12]. Згідно з даними рентгенструктурного аналізу та створеної нами тривимірної моделі каталітичного модуля синтетази триптофанові залишки в положенні 283 в димері функціональної міні *Bt*TyrRS знаходяться в області, доступній для взаємодії з тРНК.

З метою отримання білка міні *Bt*TyrRS з одним залишком триптофану в положенні 283 для дослідження властивостей фермента методами флюоресцентної спектроскопії в плазмідній конструкції рЕТ-30a(+)-39KYRS була проведена заміна триплетів триптофану в кДНК каталітичного модуля синтетази в положенні 40 та 87 на триплети аланіну методом сайт-спрямованого QuikChange мутагенезу [7]. В результаті була отримана плазмідна конструкція рЕТ-30a(+)-39KYRS283W, що має лише один кодон триптофану в положенні 283 в клонованій послідовності кДНК N-кінцевого модуля синтетази. Амінокислота аланін була вибрана для заміщення залишків триптофану в амінокислотній послідовності міні *Bt*TyrRS за її невеликим гідрофобним радикалом, який не впливає на формування суміжними амінокислотними залишками в поліпептидному ланцюзі вторинної структури білка.

Для визначення впливу заміни двох триптофанових залишків на аланін на структуру міні *Bt*TyrRS була побудована модель просторової структури мутантної форми гомодимера N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS *Bos taurus* з одним триптофановим залишком в послідовності білка в положенні 283. Розроблена модель мутантної форми міні *Bt*TyrRS приведена на рис. 1. Порівняння моделей просторових структур отриманої раніше нативної [12] та мутантної форм міні *Bt*TyrRS не виявило явних відмінностей в їх структурі.



Це свідчить про те, що заміна Trp40 та Trp87 на Ala в амінокислотній послідовності білка не привела до порушення просторової структури ензиму.

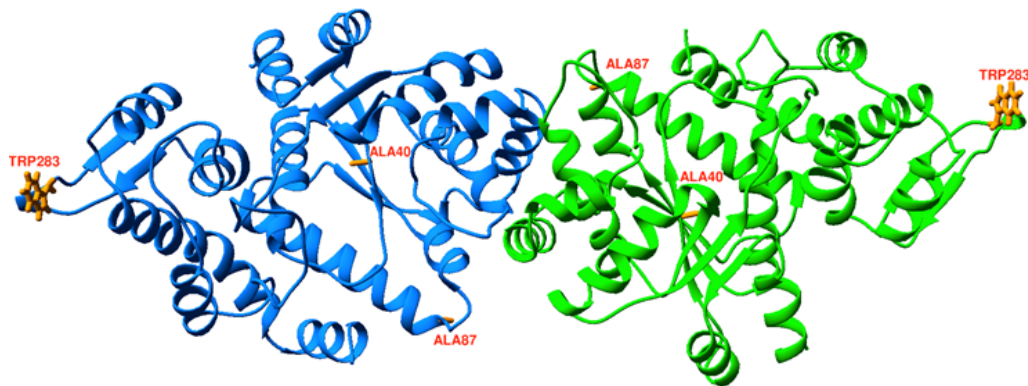


Рис. 1. Модель просторової структури гомодимера мутантної форми міні *BtTyrRS* з залишком триптофану в положенні 283. Різні мономери позначені синім та зеленим кольором

Fig.1. Model of spatial structure of the homodimer of mutant form mini *BtTyrRS* with tryptophan residues at position 283. Different monomers are highlighted in blue and green

Дослідження властивостей ферментів експериментальними методами потребує значної кількості білків. Для їх отримання в основному застосовуються генно-інженерні підходи. Бактеріальна система експресії на основі РНК-полімерази фага T7 є однією з найбільш ефективних прокариотичних систем, що використовується для отримання рекомбінантних білків як про-, так і еукаріотичного походження. Продуцентом рекомбінантних білків в цій системі є штами на основі *E. coli* BL21(DE3), в яких ген РНК-полімерази фага T7 під контролем промотора lacUV5 інтегрований в бактеріальну хромосому. Штами на основі BL21(DE3) використовуються як реципієнти різних експресувальних плазмідних векторів, в яких цільові гени вбудовуються під контроль промоторів, що впізнаються РНК-полімеразою фага T7. До таких плазмідних векторів відноситься вектор рЕТ-30a(+). Транскрипція клонуваних генів в цих векторах індукується додаванням в культуральне середовище індуктора синтезу IPTG.

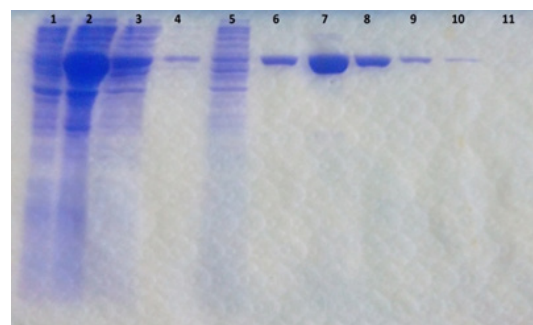
Синтез рекомбінантних білків в бактеріальних системах значною мірою залежить від умов культивування. В попередніх роботах нами були визначені оптимальні параметри експресії в бактеріальних клітинах *E. coli* штаму BL21(DE3)*pLysE* нативної повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази, нативної та мутантної міні *BtTyrRS*, в амінокислотній послідовності якої залишки Trp40 та Trp283 були замінені на залишки Ala [6, 12, 18]. В роботах досліджувався вплив на експресію міні *BtTyrRS* в експресувальному векторі рЕТ-30a(+) таких чинників, як склад культурального середовища, кількість індуктора синтезу білка, що вноситься в культуральне середовище, температурні параметри та час культивування культури до та після додавання індуктора. Було показано, що найбільш високий рівень синтезу рекомбінантної міні

BtTyrRS в культурі *E. coli* досягався при додаванні в культуральне середовище індуктора синтезу білка IPTG в концентрації 1мМ при досяганні оптичної густини $OD_{600} = 0,7-0,9$, що відповідає логарифмічній фазі росту бактеріальної культури, та інкубації культури впродовж 8 годин при 25 °С. При цій температурі інкубації бактеріальних культур відзначався найбільш високий вміст синтезованої рекомбінантної міні *BtTyrRS* в розчинній фракції клітин *E. coli*, який досягав 47% від загальної кількості синтезованого рекомбінантного білка. Було встановлено також, що склад культурального середовища не має значного впливу на експресію ферменту.

Експериментально встановлені оптимальні умови експресії каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* в *E. coli* в середовищі LB були враховані нами в роботі при отриманні препаративної кількості рекомбінантної мутантної міні *BtTyrRS* в культурі клітин *E. coli* штаму BL21(DE3) *pLysE* після трансформації штаму плазмідною конструкцією рЕТ-30a(+)-39KYRS283W.

Після лізису бактеріальних клітин та хроматографічної очистки лізату за допомогою металхелатувальної хроматографії на Ni-NTA агарозі (рис. 2) з 100 мл бактеріальної культури, інкубованої при температурі 25 °С впродовж 8 годин, було отримано з використанням при оцінці виходу білку коефіцієнта екстинції $27850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ до 3,5 мг гомогенного рекомбінантного білка мутантної міні *BtTyrRS*, чистота якого згідно гель-електрофорезу досягає 95% (рис. 3).

Кількість отриманого білка мутантної форми міні *BtTyrRS* співвідноситься з кількістю отриманого раніше у культуральному середовищі в одних і тих же умовах білка нативної форми ферменту [12]. Це свідчить, що заміна двох триптофанових залишків на аланін в положенні 40 та 87 в структурі каталітичного модуля *BtTyrRS* не впливає на синтез рекомбінантного білка в трансформованому плазмідною конструкцією рЕТ-30a(+)-39KYRS283W штамі *E. coli* BL21(DE3)*pLysE*. Відповідно, з одного літра бактеріальної культури у використаних нами умовах експресії можна отримати до 35 мг очищеного рекомбінантного ензиму.



№	
1	Лізат до індукції
2	Лізат після індукції IPTG
3	Супернатант
4	Промивка
5	Проскок
6	6-10-фракції елюції
11	Змив

Рис 2. Електрофоретичний аналіз експресії та очистки мутантної форми mini-TyrRS на Ni-NTA агарозі

Fig. 2. Electrophoretic analysis of expression and purification of the mutant form of mini-TyrRS on Ni-NTA agarose



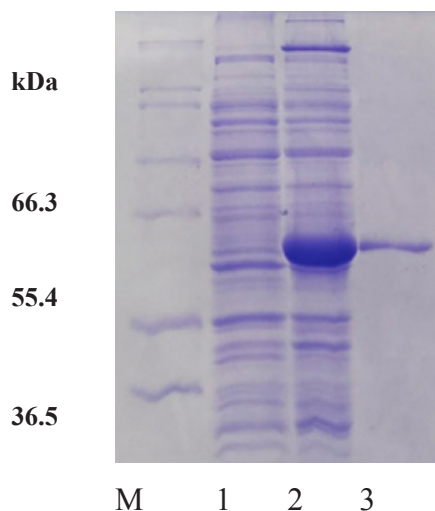


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз експресії мутантної форми каталітичного модуля тирозинової аміноацил-тРНК синтетази *Bos taurus* в штамі *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* та електрофоретичний контроль чистоти мутантного білка після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарози (12%-ий поліакриламідний гель)

М – Маркерна суміш білків (“Invitrogen”, Mark 12 Unstained Standart)

1 – Клітинний лізат трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW283 бактеріальної культури штаму BL21(DE3)*pLysE* до індукції IPTG синтезу мутантної форми міні *BtTyrRS*

2 – Клітинний лізат трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW283 бактеріальної культури штаму BL21(DE3)*pLysE* після індукції IPTG синтезу мутантної форми міні *BtTyrRS*

3 – Мутантна міні *BtTyrRS* після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарози

Fig. 3. Electrophoretic analysis of the expression of the mutant form of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase catalytic module in *E. coli* BL21(DE3) *pLysE* strain and electrophoretic control of the purity of the mutant protein after chromatographic purification on Ni-NTA agarose (12% polyacrylamide gel).

М – Mixture of marker protein ("Invitrogen", Mark 12 Unstained Standart).

1 – Cell lysate of bacterial culture of *E. coli* strain BL21(DE3)*pLysE* transformed with plasmid рЕТ30а-39KYRSW87 before IPTG induction of mutant mini *BtTyrRS* synthesis.

2 – Cell lysate of bacterial culture of *E. coli* strain BL21(DE3) *pLysE* transformed with plasmid рЕТ30а-39KYRSW40 after IPTG induction of mutant form mini *BtTyrRS* synthesis.

3 – Mutant mini *BtTyrRS* after chromatographic purification on Ni-NTA agarose.

Для оцінки стану отриманої за допомогою металхелатувальної хроматографії мутантної форми каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази була застосована флуоресцентна спектроскопія. Спектри флуоресценції мутантної форми каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *B. taurus* за довжини хвилі збудження 280 нм (спектр флуоресценції білка зумовлений сумарним випромінюванням тирозинових та триптофанового залишків) та 295 нм (спектр флуоресценції зумовлений випромінюванням лише триптофанового залишку) приведені на рис.4. Флуоресцентні характеристики емісії триптофанового залишку отриманого рекомбінантного білка, ширина спектра флуоресценції $\Delta\lambda$ та положення максимуму флуоресценції, становлять, відповідно, близько 57 нм та 345 нм (рис. 4). Параметри спектрів флуоресценції

триптофанових залишків залежать від полярності мікрооточення, а також їх здатності релаксувати за час життя флуоресценції. Полярність мікрооточення триптофанового залишку визначається як його доступністю для молекул розчинника, так і власними полярними групами білка, які входять до складу мікрооточення. Згідно моделі трьох спектральних класів залишків триптофану в структурі білків [19] триптофановий залишок в положенні 283 відноситься більшою мірою до спектрального класу II, що характеризується емісією іммобілізованого на поверхні білка індольного флуорофора, який в основному контактує зі зв'язаною водою та іншими полярними групами в структурі протеїну.

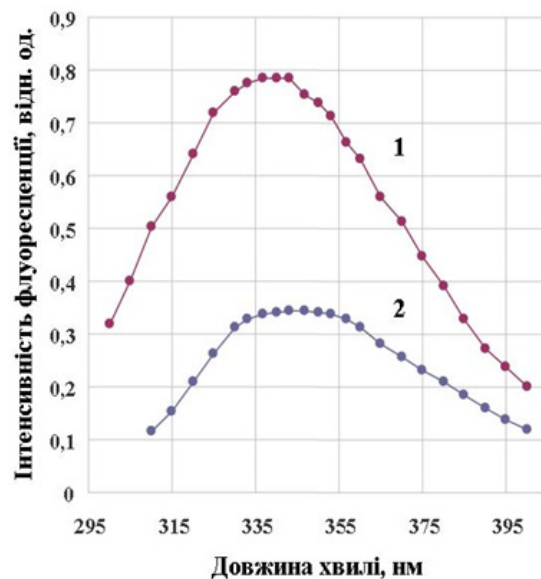


Рис. 4. Спектри флуоресценції мутантної форми міні TyrRS при довжині збудження 280 нм (1) та 296 нм (2)

Fig. 4. Fluorescence spectra of the mutant form of mini TyrRS at excitation wavelengths of 280 nm (1) and 296 nm (2)

Раніше нами була вивчена власна триптофанова флуоресценція нативної міні TyrRS і проаналізована її внутрішньомолекулярна динаміка методами флуоресцентної спектроскопії [20]. Проведений аналіз локалізації та властивостей мікрооточення 3-х триптофанових залишків, відповідальних за власну флуоресценцію міні TyrRS, дозволив охарактеризувати їх доступність в структурі димера фермента та конформаційну рухливість їх мікрооточення. Характеристики триптофанової флуоресценції мутантної форми міні TyrRS з залишками триптофанів у положенні 283 свідчать про іммобілізацію і компактний стан оточення триптофанових залишків в гомодимері ензиму та збереження нативної конформації синтетази.

Дані підтверджуються подібністю просторових структур нативної та мутантної форм міні *Bt*TyrRS та аналізом їх властивостей за допомогою програми ProtParam, згідно якої індекси нестабільності останніх майже однакові



і дорівнюють відповідно 36,2 та 37,15, що свідчить про стабільність рекомбінантного білка.

В результаті проведеної роботи встановлено, що заміна кодонів триптофану в положеннях 40 та 87 на кодони аланіну в кДНК каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* не впливає на синтез мутантної форми ферменту в клітинах *E. coli* та її структуру. Вихід очищеного гомогенного білка мутантної міні *BtTyrRS* при інкубації культури трансформованого плазмідом рЕТ30а-39KYRSW283 штаму *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* при 25 °С складає в середньому 35 мг з 1 л культурального середовища LB, що є достатнім для проведення подальших структурно-функціональних досліджень мутантної форми *BtTyrRS*. Згідно оцінки просторової структури та флуоресцентних даних структура мутантної форми синтетази перебуває в компактному стані.

V.N. Zayets, L.A. Kolomiets, O.Yu. Tsuvarev, A.I. Kornelyuk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03143
v.n.zayets@gmail.com

ISOLATION AND STRUCTURE ANALYSIS OF THE MUTANT FORM OF N-TERMINAL CATALYTIC MODULE OF *BOS TAURUS* TYROSYL-tRNA SYNTHETASE WITH REPLACEMENT OF Trp 40 AND Trp 87 BY ALANINE

Summary

Aim. Isolation and analysis of the structure of the mutant monotryptophan protein mini *BtTyrRS* for study of conformational changes of the enzyme at the stage of interaction with tRNA using fluorescence spectroscopy and determination of the effect of tryptophan residues in position 40 and 87 in its structure on the functional properties of the enzyme. **Methods.** Electrophoresis, metal-chelating affinity chromatography, fluorescence spectroscopy, spatial structure modeling. **Results.** It was found that the replacement of two codons of Trp by codons of Ala in the cloned cDNA mini *BtTyrRS* does not affect the synthesis of the mutant form of the enzyme in *E. coli* strain BL21 (DE3) *pLysE*. The yield of affinity purified protein on Ni-NTA agarose is on average 3.5 mg per 100 ml of culture medium. Computer modeling of the structure and fluorescence spectroscopy of the monotryptophan form of mini *BtTyrRS* indicates a compact structure of the mutant enzyme, in which Trp 283 is in an immobilized microenvironment. **Conclusions.** Affinity purified on Ni-NTA agarose mutant monotryptophan protein mini *TyrRS* have been obtained which is suitable for fluorescent studies of structural-dynamic and functional properties of the enzyme.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, mutant form of mini *TyrRS*, bacterial expression



В.Н. Заец, Л.А. Коломиец, А.Ю. Цуварев, А.И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ N-КОНЦЕВОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-tРНК СИНТЕТАЗЫ *BOS TAURUS* С ЗАМЕНОЙ Trp 40 И Trp 87 НА АЛАНИН

Реферат

Цель. Выделение и анализ структуры мутантного однотриптофанового белка мини *VtTyrRS* для исследования с помощью методов флуоресцентной спектроскопии конформационных изменений фермента в процессе взаимодействия с тРНК и определения влияния остатков триптофана в положении 40 и 87 в его структуре на функциональные свойства энзима. **Методы.** Электрофорез, металл-хелатирующая аффинная хроматография, флуоресцентная спектроскопия, моделирование пространственной структуры. **Результаты.** Установлено, что замена двух кодонов аминокислоты триптофана на кодоны аминокислоты аланина в клонированной кДНК мини *VtTyrRS* не влияет на синтез мутантной формы фермента в штамме *E. coli* BL21 (DE3) *rLysE*. Выход аффинно очищенного на Ni-NTA агарозе белка составляет в среднем 3,5 мг с 100 мл культуральной среды. Компьютерное моделирование структуры и флуоресцентная спектроскопия однотриптофановой формы мини *VtTyrRS* указывают на компактную структуру мутантного фермента, в которой Trp 283 находится в иммобилизованном микроокружении. **Выводы.** Получен аффинно очищенный на Ni-NTA агарозе мутантный однотриптофановый белок мини *VtTyrRS*, пригодный для флуоресцентных исследований структурно-динамических и функциональных свойств фермента.

Ключевые слова: тирозил-tРНК синтетаза, мутантная форма мини *TyrRS*, бактериальная экспрессия

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Homes M.A.R., Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthetases // RNA. – 2020. – Vol. 26. – P. 910–936.
2. Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование тирозил-tРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1998. – 14, № 4. – С. 349–359.
3. Kornelyuk A.I., Tas M.P., Dubrovsky A., Murray C.J. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolym. Cell. – 1999. – Vol. 15, № 2. – P. 168–172.
4. Guo M., Schimme I P. Essential nontranslational functions of tRNA synthetases // Nat. Chem. Biol. – 2013. – Vol. 9, № 3. – P. 145–153.
5. Туроверов К.К., Кузнецова И.М. Собственная флуоресценция глобулярного актина. Особенности локализации триптофановых остатков // Биорганическая химия. – 1998. – 24, № 12. – P. 893–898.
6. Кондратюк Ю., Бабарик М., Корнелюк О. Оптимізація процесу біос-



- интезу каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази ссавців та його дослідження імунохімічними методами // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія біологія. – 2009. – № 56. – С. 33–35.
7. Zayets V.N., Tsuvarev A. Yu., Kolomiets L.A., Korneliuk A.I. Site-directed mutagenesis of tryptophan residues in the structure of the catalytic module of tyrosyl-tRNA synthetase from *Bos taurus* // Cytol. Genet. – 2019. – Vol. 53, № 3. – P. 47–57.
 8. Rosano G.L., Cessarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges // Front. Microbiol. – 2014. Vol. 5. – P. 1–17.
 9. Joseph B.C., Pichaimuthu S., Srimeenakshi S., Murthy M., Selvakumar K., Ganesan M., Manjunath S.R. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* // J. Cell. Sci. Ther. – 2015. – Vol. 6, № 5. 221. doi:org/10.4172/2157-7013.1000221
 10. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids // Gene. – 1990. – № 96. – P. 23–28.
 11. Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2th ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 12. Zayets V.N., Lozhko D.M., Tsuvarev O.Yu., Kolomiets L.A., Zub P.E., Korneliuk A.I. Isolation and characterization of the mutant form of N-terminal catalytic module of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase with replacement of Trp 40 and Trp 283 by alanine // Biopolym. Cell. – 2020. – Vol. 36, № 5. – P. 329–340.
 13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
 14. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISSMODEL: homology modeling of protein structures and complexes // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W296–W303.
 15. Леванец О.В., Найденов В.Г., Вудмаска М.И., Одынец К.А., Мацука Г.Х., Корнелюк А.И. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1996. – 12, № 5. – С. 66–70.
 16. Yang X.-L., Skene R.G., McRee D.E., Schimmel P. Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine // PNAS. – 2002. – Vol. 99, № 24. – P. 15369–15374.
 17. Kravchuk O.V., Savytskyi O.V., Odynets K.O., Mykuliak V.V., Korneliuk A.I. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates // J. Biomol. Struct. Dynamics. – 2016. – Vol. 35, № 13. – P. 2772–2788.
 18. Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М.А., Корнелюк О.И. Оптимізація бактеріальної експресії тирозил-тРНК синтетази ссавців при культивуванні штаму *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysE* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – 4, №8. – С. 6–12.
 19. Reshetnyak Y.K., Burnstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluo-



rescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins // *Biophysical J.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1710–1734.

20. Чиста С.В., Корнелюк О.І. Флуоресценція і динаміка мікрооточення триптофанових залишків евкаріотної тирозил-ТРНК синтетази // *Фізика живого.* – 2014. – № 21(1-2). – С. 24–28.

REFERENCES

1. Homes MAR., Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA.* 2020; 26: 910–936.
2. Kornelyuk AI. Structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym. Cell.* 1998; 14(4): 349–359 (in Russian).
3. Kornelyuk AI, Tas MP, Dubrovsky A, Murray CJ. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym. Cell.* 1999; 15(2): 168–72.
4. Guo M, Schimmel P. Essential nontranslational function of tRNA synthetases. *Nat. Chem. Biol.* 2013; 9(3): 145–153.
5. Turoverov KK, Kuznetsova IM. The intrinsic fluorescence of globular actin: peculiarities in the location of tryptophan residues. *Bioorg. Chem.* 1998; 24(12): 893–898 (in Russian).
6. Kondratyuk YuYu, Babaryk MA, Kornelyuk AI. Optimization of the process of biosynthesis of the mammalian tyrosyl-tRNA synthetase catalytic module and its study by immunochemical methods. *Bulletin of Kyiv Taras Shevchenko National University, series Biology.* 2009; 56: 33–35 (in Ukrainian).
7. Zayets VN, Tsuvarev AYU, Kolomiets LA, Kornelyuk AI. Site-directed mutagenesis of tryptophan residues in the structure of the catalytic module of tyrosyl-tRNA synthetase from *Bos taurus*. *Cytol. Genet.* 2019; 53(3): 47–57.
8. Rosano GL, Cessarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1–17.
9. Joseph BC, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S, Murthy M, Selvakumar K, Ganesan M, Manjunath SR. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *J. Cell. Sci. Ther.* 2015; 6(5): 221. doi:org/10.4172/2157-7013.1000221
10. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids. *Gene.* 1990; 96: 23–28.
11. Sambrook J, Fritsch T, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Zayets VN, Lozhko DM, Tsuvarev OYu, Kolomiets LA, Zub PE, Kornelyuk AI. Isolation and characterization of the mutant form of N-terminal catalytic module of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase with replacement of Trp40 and Trp283 by alanine. *Biopolym. Cell.* 2020; 36(5): 329–340.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–685.
14. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-



- MODEL: homology modeling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1): W296–W303.
15. Levanets OV, Naidenov VG, Woodmaska MI, Odynets KA, Matsuka GH, Kornelyuk AI. PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleotide binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym. Cell.* 1996; 12(5): 66–70 (in Russian).
 16. Yang X-L, Skene RG, McRee DE, Schimmel P. Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytosine. *PNAS.* 2002; 99(24): 15369–15374.
 17. Kravchuk OV, Savytskyi OV, Odynets KO, Mykuliak VV, Kornelyuk AI. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates. *J. Biomol. Struct. Dynamics.* 2016; 35(13): 2772–2788.
 18. Kondratyuk YuYu, Babaryk MA, Kornelyuk AI. Bacterial expression optimization of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase on strain *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysE cultivation. *Microbiology & Biotechnology.* 2009; 4(8): 6–12 (in Ukrainian).
 19. Reshetnyak YK, Burnstein EA. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. *Biophysical J.* 2001; 81: 1710–1734.
 20. Chysta SV, Kornelyuk AI. Fluorescence and dynamics of microenvironment of tryptophan residues in mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Physics of the alive.* 2014; 21(1-2): 24–28 (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 27.07.2021 р.

