

## Сравнительное исследование физико-химических свойств тирозил-тРНК синтетаз из *Thermus thermophilus* и *Escherichia coli*

С. П. Егорова, А. Д. Яремчук, М. А. Тукало

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

Проведено сравнение физико-химических свойств тирозил-тРНК синтетаз (КФ 6.1.1.1) из *T. thermophilus* и *E. coli*. Определены величины констант Михаэлиса для тРНК<sup>Tyr</sup> из мезофила и термофила, L-тирозина и АТФ в реакции аминоацилирования тирозил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus* при 37, 65 и 75 °С, оптимальные концентрации КСl в реакциях перекрестного аминоацилирования. Осуществлен сравнительный анализ аминокислотного состава термофильной и мезофильной тирозил-тРНК синтетаз. Получены температурные зависимости скоростей реакций пирофосфатного обмена и аминоацилирования тРНК, температурные зависимости термостабильности обоих ферментов.

**Введение.** Аминоацил-тРНК синтетазы представляют группу ферментов, играющих существенную роль в реализации генетической информации. Их специфическое взаимодействие с тРНК до сих пор является одной из важнейших проблем молекулярной биологии. Особый интерес вызывает функционирование аминоацил-тРНК синтетаз при высоких температурах.

Изучение особенностей функционирования аминоацил-тРНК синтетаз при высоких температурах и взаимосвязь их с термостабильностью имеют большое значение для понимания природы и механизмов взаимодействия этих ферментов с субстратами. Поэтому одним из подходов к исследованию природы термостабильности белков является сравнительное изучение их физико-химических свойств, взаимосвязи между термостабильностью и функцией аналогичных ферментов из мезофильных и термофильных источников.

Тирозил-тРНК синтетаза из экстремального термофила *T. thermophilus*, живущего при 75 °С, была выделена в гомогенном состоянии и кратко охарактеризована лишь недавно [1], в то время

как ферментативные свойства и структура активного центра тирозил-тРНК синтетаз из *E. coli* и *Bacillus stearothermophilus* изучались в течение ряда лет [2–7]. Целью настоящей работы было сравнительное исследование физико-химических свойств тирозил-тРНК синтетаз из термофила (*T. thermophilus*) и мезофила (*E. coli*).

**Материалы и методы.** Биомасса *T. thermophilus* НВ-27 была наработана в ИБФМ АН России (Пушино). Суммарный препарат тРНК из *E. coli*, содержащий 0,93 % тРНК<sup>Tyr</sup>, получен из НИИ прикладной биохимии (Олайн, Латвия). Суммарный препарат тРНК из *T. thermophilus*, содержащий 1,1 % тРНК<sup>Tyr</sup>, получен нами, как описано в [8], с некоторыми модификациями.

Пострибосомный супернатант *E. coli*, содержащий тирозил-тРНК синтетазу, любезно предоставлен О. И. Лаврик (Институт биоорганической химии, Россия).

В работе использовали ДЭАЭ-целлюлозу DE-52 («Whatman», Англия), ДЭАЭ-сефарозу («Pharmacia», Швеция), Тоуорепарл НВ-65 («Toyo Soda», Япония), оксиапатит («Bio-Rad», США), гепарин-сефарозу («Pharmacia»). Выделение препарата тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* НВ-27 и определение тирозил-тРНК синтетазной

активности в реакции аминоацилирования проводили, как описано ранее [1]. Для выделения препарата тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli* MRE-600 использовали высаливание сульфатом аммония, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, ДЭАЭ-сефарозе, оксиапатите и гепарин-сефарозе. Осадок, полученный после высаливания пострибосомного супернатанта сульфатом аммония (50 % насыщения), диализовали против 25 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,6, содержащего 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид, 0,1 мМ азид натрия (буфер А). Диализ проводили в течение 20 ч со сменой буфера. Белок наносили на колонку (4,5 × 47 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной буфером А.

Белок элюировали 2,5 л в градиенте концентрации от 0,05 М калий-фосфатного буфера, рН 7,6, до 0,25 М калий-фосфатного буфера, рН 6,5. Фракции, содержащие тирозил-тРНК синтетазную активность, высаливали сульфатом аммония (50 % насыщения) и хроматографировали на колонке (3 × 27 см) с ДЭАЭ-сефарозой в буфере Б: 20 мМ трис-НСl буфер, рН 7,9, содержащий 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ азид натрия, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид и 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Белок элюировали в том же буфере в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,3 М. Объем градиента составлял 1400 мл.

Активную фракцию тирозил-тРНК синтетазы диализовали в течение 20 ч против 5 мМ калий-фосфатного буфера, рН 6,8, содержащего 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ азид натрия, 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторид (буфер В), и наносили на колонку (2,5 × 14,3 см) с оксиапатитом, уравновешенным буфером В.

Фермент элюировали 1 л линейного градиента концентрации калий-фосфатного буфера от 0,01 до 0,4 М. Фракцию, обладающую тирозил-тРНК синтетазной активностью, диализовали в буфере Б, наносили на колонку (0,5 × 15 см) с гепарин-сефарозой, уравновешенной буфером Б. Белок элюировали в том же буфере в градиенте концентрации KCl от 0 до 0,25 М. Объем градиента составлял 0,5 л. Очищенный препарат тирозил-тРНК синтетазы хранили при -20 °С в буфере Б, содержащем 50 % глицерина.

Кинетические свойства тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* изучали, варьируя концентрацию одного субстрата при насыщающих концентрациях других субстратов при 37 и 65 °С.

Концентрации субстратов варьировали в следующих пределах: АТФ — от  $2,5 \cdot 10^{-5}$  до  $5 \cdot 10^{-4}$  М, L-тирозин — от  $2 \cdot 10^{-6}$  до  $1,8 \cdot 10^{-5}$  М, тРНК<sup>Tyr</sup> из *E. coli* — от  $0,5 \cdot 10^{-7}$  до  $1 \cdot 10^{-6}$  М, тРНК<sup>Tyr</sup> из *T.*

*thermophilus* от  $0,4 \cdot 10^{-7}$  до  $1,5 \cdot 10^{-6}$  М. Кинетические данные обрабатывали по методу двойных обратных величин Лайнуивера-Берка [9] с использованием компьютерной программы Enzfitter [10].

Аминокислотный состав тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* определен И. В. Назимовым (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Россия). Метод, использованный для определения аминокислотного состава, не позволил определить содержание Cys и Trp аминокислотных остатков.

Стандартная смесь для определения активности в реакции аминоацилирования тРНК при различных температурах содержала в 0,05 мл: 100 мМ трис-НСl буфер, рН 8,0, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 мМ АТФ, 0,2 мМ [<sup>14</sup>C]тирозин, 5 мг/мл суммарного препарата тРНК *E. coli* или *T. thermophilus*, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0,8 мкг/мл тирозил-тРНК синтетазы. Время инкубации составляло 0,5 мин при различных температурах. Реакцию останавливали, как описано в [1]. Реакцию пирофосфатного обмена проводили в инкубационной смеси объемом 0,1 мл, содержащей 100 мМ трис-НСl, рН 8,0, 2,5 мМ АТФ, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,5 мМ L-тирозин, 20 мкг бычьего сывороточного альбумина, 5—10 мкМ [<sup>32</sup>P]пирофосфата аммония. Инкубировали в течение 5 мин при различных температурах. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,2 М пирофосфата натрия в 5 %-м растворе трихлоруксусной кислоты, затем в пробы вносили 0,2 мл 5 %-й водной суспензии активированного угля Norit А («Serva», ФРГ), пробы оставляли на 30 мин при 0 °С. Осадки наносили на фильтры GF/C («Whatman», Англия), отмывали 60 мл дистиллированной воды и закрепляли на фильтрах пропусканием 2 мл 2 %-го раствора поливинилового спирта в воде.

Кривые термоинактивации мезофильного и термофильного ферментов получены измерением их остаточной активности методом пирофосфатного обмена. Белок растворяли в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Белковую смесь инкубировали при различных температурах. Через определенные промежутки времени из этой смеси отбирали аликваты объемом 20 мкл, содержащие по 0,04 мкг фермента.

Остаточную активность белка в отобранных аликватах определяли с помощью пирофосфатного обмена: 5 мин при 30 и 65 °С для мезофильного и термофильного ферментов соответственно. Для устранения эффекта испарения при инкубировании белка при высоких температурах на поверхность белковой смеси настилали парафиновое масло

(«Флика», Швейцария). Кривые термостабильности тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli* получены измерением их остаточной активности после инкубации в течение 5 мин при различных температурах методом пирофосфатного обмена. Для изучения защитного эффекта тРНК при термоинактивации белка в белковую смесь вносили суммарную тРНК из *T. thermophilus* или *E. coli* в расчете 100 мкг на 0,04 мкг фермента.

Результаты и обсуждение. Для выяснения структурных различий, обеспечивающих возможность функционирования термофильной тирозил-тРНК синтетазы при высоких температурах, проведено сравнение аминокислотных составов термофильного и мезофильного ферментов. Аминокислотный состав тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli* определен ранее [2]. Поскольку молекулярные массы ферментов немного отличаются (на  $\approx 5\%$ ), для более корректного сравнения данные для каждого типа аминокислотных остатков были представлены в виде мольных долей, выраженных в процентах.

Как видно из сравнительной диаграммы на рис. 1, термофильный фермент содержит значительно большее количество Pro, Leu, Arg и меньшее количество Asp, Lys по сравнению с мезофильным ферментом. Количество гидрофобных аминокислот в мезофильном белке составляет 40%, в то время как фермент из *T. thermophilus* содержит 48% гидрофобных остатков. Увеличение содержания гидрофобных аминокислот было показано для тер-

мофильных фенилаланил-тРНК синтетазы [11] и серил-тРНК синтетазы [12] по сравнению с аналогичными мезофильными ферментами. На основании полученных данных мы предположили, что в случае тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* экстремальная термофильность фермента обеспечивается заметным изменением аминокислотного состава за счет увеличения содержания гидрофобных аминокислотных остатков. Хотя данное предположение и не является общим правилом, как, например, в случае с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, где увеличения содержания гидрофобных аминокислотных остатков не наблюдалось [13].

Для дальнейшей работы с тирозил-тРНК син-

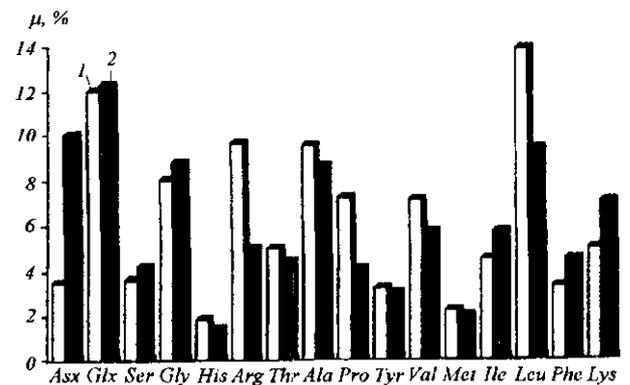


Рис. 1. Сравнительный аминокислотный состав тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli* (в мольных %): 1 — фермент из *T. thermophilus*; 2 — фермент из *E. coli*

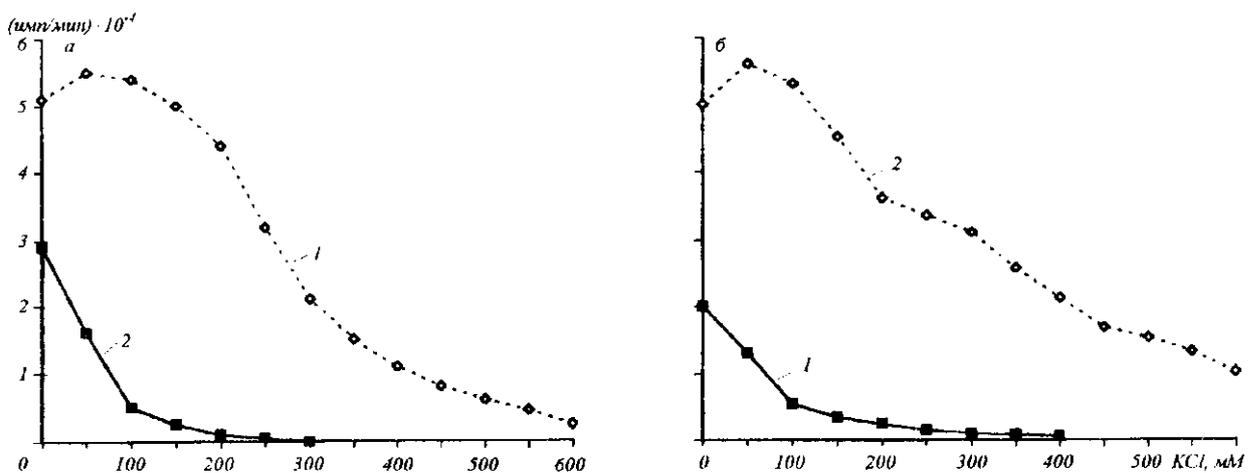


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей образования тирозил-тРНК, катализируемых тирозил-тРНК синтетазами из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б), от концентрации KCl при использовании тРНК из *T. thermophilus* (1) и *E. coli* (2)

тетазой из *T. thermophilus* были проведены эксперименты по определению участков прямолинейной зависимости образования тирозил-тРНК<sup>Tyr</sup> от времени инкубации и определению концентрации субстратов, не лимитирующих начальной скорости образования тирозил-тРНК<sup>Tyr</sup>. Изучение влияния концентраций тРНК и Mg<sup>2+</sup>, не лимитирующих начальной скорости реакции, показало, что они составляют при 0,04 мкг фермента: 250 мкг тРНК и 15–20 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Сравнение реакций аминокислотирования тРНК<sup>Tyr</sup> из *T. thermophilus* и *E. coli*, катализируемых термофильным ферментом, показало, что уровень аминокислотирования для гомологичной тРНК<sup>Tyr</sup> повышается с ростом концентрации KCl от 0 до оптимальной 80 мМ и затем слабо уменьшается при дальнейшем увеличении концентрации KCl до 200 мМ. При последующем возрастании концентрации KCl уровень аминокислотирования значительно падает. Для гетерологичной тРНК<sup>Tyr</sup> из *E. coli* имеет место значительное уменьшение уровня аминокислотирования при увеличении концентрации KCl от 0 до 300 мМ (рис. 2, а).

Аналогичный эксперимент был проведен для тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli*. Оптимум аминокислотирования мезофильного фермента с гомологичной тРНК<sup>Tyr</sup> имеет место при 20 мМ KCl, тогда как для гетерологичной тРНК<sup>Tyr</sup> наблюдается резкое уменьшение уровня аминокислотирования при увеличении концентрации KCl от 0 до 300 мМ (рис. 2, б). Такие значительные различия влияния ионов калия предполагают, что особенности образования продуктивного комплекса тРНК — синте-

таза существенно отличаются для гомологичного и гетерологичного комплексов.

Как показано ранее [1], температурный оптимум реакции аминокислотирования, катализируемой термофильной тирозил-тРНК синтетазой, находится в области 75 °С для тРНК<sup>Tyr</sup> *T. thermophilus*; для гетерологичной тРНК<sup>Tyr</sup> — при 50 °С (рис. 3, а). В случае фенилаланил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* температурные оптимумы находятся в области 70 и 80 °С соответственно [14]. Эти показатели были изучены также для реакции аминокислотирования, катализируемой тирозил-тРНК синтетазой из *E. coli*. Они находятся в области 41 °С для гомологичной тРНК и 45 °С — для гетерологичной (рис. 3, б).

Как видно из графиков, температурные оптимумы реакции аминокислотирования, катализируемой термофильной синтетазой, значительно отличаются для гомологичной и гетерологичной тРНК. Разница между ними составляет 25 °С. Такое существенное различие, очевидно, связано с некоторыми структурными отличиями тРНК<sup>Tyr</sup> *T. thermophilus* и *E. coli*, определяющих оптимальное узнавание тирозил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus*. В случае мезофильного фермента разница между температурными оптимумами составляет всего 4 °С.

Константы Михаэлиса для АТР, L-тирозина, тРНК<sup>Tyr</sup> из *T. thermophilus* и *E. coli* при различных температурах в реакции аминокислотирования, катализируемой тирозил-тРНК синтетазой из *T. thermophilus*, приведены в табл. 1. При сравнении кинетических характеристик термофильного фер-

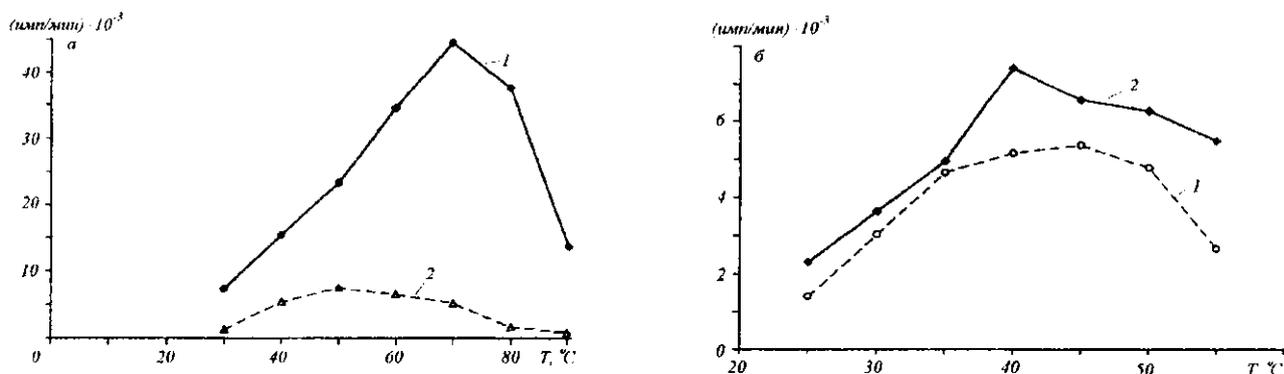


Рис. 3. Зависимость начальных скоростей образования тирозил-тРНК, катализируемых тирозил-тРНК синтетазами из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б), от температуры: 1 — тРНК из *T. thermophilus*; 2 — тРНК из *E. coli*

Таблица 1  
Константы Михаэлиса для субстратов тирозил-тРНК синтетазы в реакциях аминокислотирования тРНК

| Источник тирозил-тРНК синтетазы | Температура, °С | L-Тирозин            |                             | АТФ                 |                             | тРНК <sup>Tyr</sup> <i>T. thermophilus</i> |                             | тРНК <sup>Tyr</sup> <i>E. coli</i> |                             |
|---------------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
|                                 |                 | К <sub>М</sub> , мкМ | V <sub>max</sub> , моль/мин | К <sub>М</sub> , мМ | V <sub>max</sub> , моль/мин | К <sub>М</sub> , мкМ                       | V <sub>max</sub> , моль/мин | К <sub>М</sub> , мкМ               | V <sub>max</sub> , моль/мин |
| <i>T. thermophilus</i>          | 37              | 7,81                 | 4,05 · 10 <sup>-7</sup>     | 0,08                | 6,4 · 10 <sup>-7</sup>      | 0,55                                       | 4,4 · 10 <sup>-7</sup>      | 0,85                               | 4,3 · 10 <sup>-7</sup>      |
|                                 | 65              | 15,1                 | 1,75 · 10 <sup>-6</sup>     | 0,146               | 1,4 · 10 <sup>-6</sup>      | 0,64                                       | 1,9 · 10 <sup>-6</sup>      | 0,74                               | 1,4 · 10 <sup>-7</sup>      |
|                                 | 75              | —                    | —                           | 0,142               | 1,4 · 10 <sup>-6</sup>      | —  | —                           | —                                  | —                           |
| <i>E. coli</i>                  | 37              | 27                   | —                           | 0,4                 | —                           | —  | —                           | > 0,1                              | —                           |

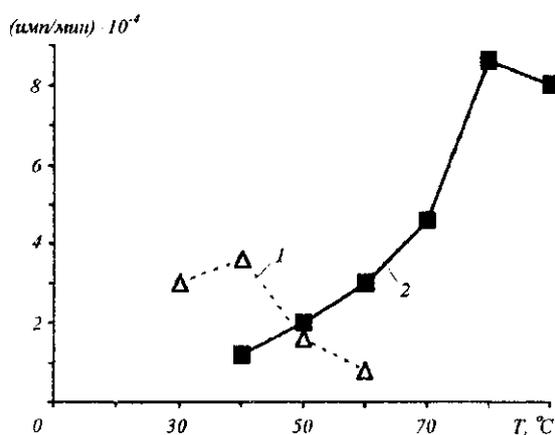


Рис. 4. Температурные зависимости скоростей пирогликолатного обмена для тирозил-тРНК синтетаз из *E. coli* (1) и *T. thermophilus* (2)

мента и ферментов *E. coli* следует отметить тот факт, что величины К<sub>М</sub> для АТФ и аминокислоты в реакции аминокислотирования мезофильным ферментом в 5 и 3,5 раза соответственно выше аналогичных величин К<sub>М</sub> для тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus*, что отражает повышенное сродство термофильного фермента к АТФ и аминокислоте.

Кроме того, с повышением температуры от 65 до 75 °С величина К<sub>М</sub> для АТФ из термофильного фермента не менялась. Значения К<sub>М</sub> для тРНК<sup>Tyr</sup> из *E. coli* и *T. thermophilus* в реакции аминокислотирования термофильным ферментом при 37 и 65 °С практически одинаковы. В то же время происходит увеличение V<sub>max</sub>.

Известно, что большинство аминокислот-тРНК

синтетаз нестабильно при повышенной температуре. В качестве характеристики термостабильности ферментов могут служить константы термоинактивации [15, 16]. Мы установили, что температурный оптимум реакции пирогликолатного обмена находится в области 40 °С для мезофильного фермента и 81 °С — для термофильного (рис. 4).

Было также проведено сравнительное исследование кинетики тепловой инактивации тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli*. Тирозил-тРНК синтетазу из *T. thermophilus* термоинактивировали при 65, 71, 77, 85, 92 °С, а фермент из *E. coli* — при 30, 41, 44, 52 °С. Препараты фермента прогревали на водяной бане в течение 0, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 мин и измеряли остаточную активность в реакции пирогликолатного обмена. Результаты этих исследований приведены на рис. 5 (а, б) и в табл. 2.

Температурные зависимости скоростей пирогликолатного обмена, аминокислотирования и кривые термостабильности обоих ферментов представлены на рис. 6. Как видно, в случае мезофильного фермента в области повышенных температур наблюдается хорошая корреляция термостабильности и каталитической активности как в реакции пирогликолатного обмена, так и в реакции аминокислотирования. Падение каталитической активности после 41 °С и незначительную разницу между температурными оптимумами для гомологичной и гетерологичной тРНК<sup>Tyr</sup> в реакции аминокислотирования можно объяснить термоденатурацией фермента.

Совершенно другая картина наблюдалась в случае термофильного фермента. Вплоть до 81 °С фермент сохранял способность катализировать пирогликолатный обмен и, по крайней мере, вплоть до 65 °С обладал термостабильностью. В то же время уже после 75 °С отмечалось уменьшение скорости

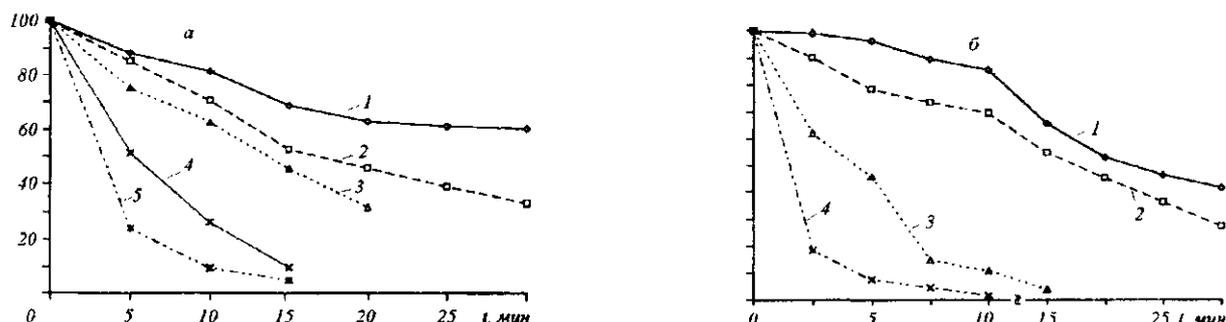


Рис. 5. Термоинактивация тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* (а) и *E. coli* (б) при температурах: а — 65 (1); 71 (2); 77 (3); 82 (4); 92 °С (5), б — 31 (1); 41 (2); 44 (3); 52 °С (4)

Таблица 2  
Константы скорости термоинактивации тирозил-тРНК синтетаз из *T. thermophilus* и *E. coli*

| Источник тирозил-тРНК синтетазы | Температура, °С | $K_t$ , мин <sup>-1</sup> |
|---------------------------------|-----------------|---------------------------|
| <i>T. thermophilus</i>          | 65              | $2,38 \cdot 10^{-2}$      |
|                                 | 71              | 3,73                      |
|                                 | 77              | 5,14                      |
|                                 | 85              | 14,26                     |
|                                 | 92              | 24                        |
| <i>E. coli</i>                  | 30              | 2,05                      |
|                                 | 41              | 4,038                     |
|                                 | 44              | 15,3                      |
|                                 | 52              | 57,1                      |

аминоацилирования тРНК<sup>Tyr</sup>. Очевидно, причиной того, что скорость реакции аминоацилирования падает при температурах выше 75 °С является не термоинактивация тирозил-тРНК синтетазы, а термоденатурация тРНК.

Сравнивая кривые термостабильности и скорости пирофосфатного обмена, мы наблюдаем противоречивую картину: при достаточно быстром падении термостабильности фермента при повышении температуры от 65 до 92 °С скорость пирофосфатного обмена, катализируемого термофильной синтетазой, достигает оптимума при 81 °С и незначительно уменьшается (на 6 %) при 92 °С. Можно предположить, что в реакции пирофосфатного обмена при связывании фермента с АТР и аминокислотой происходит изменение конформации белка, ее стабилизация, что и является причиной увеличения активности фермента. Конформационные изменения в ферменте, стабилизирующие его структуру, при связывании с субстратом показаны в работе [17] для тирозил-тРНК синтетазы из *B. stearothermophilus*.

Были также проведены эксперименты по защите тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* в реакции термоинактивации при 77 °С термофильной и мезофильной суммарной тРНК. Результаты представлены на рис. 7. Добавление суммарной тРНК из *T. thermophilus* и *E. coli* в реакционную смесь позволяло ферменту сохранять 100 %-ю активность в последующей реакции пирофосфатного обмена в отличие от свободного фермента. В случае тирозил-тРНК синтетазы из *E. coli* фермент мгновенно терял активность после инкубирования при 77 °С, несмотря на присутствие мезофильной или термофильной тРНК. Очевидно, что защита фермента тРНК возможна лишь в той температур-

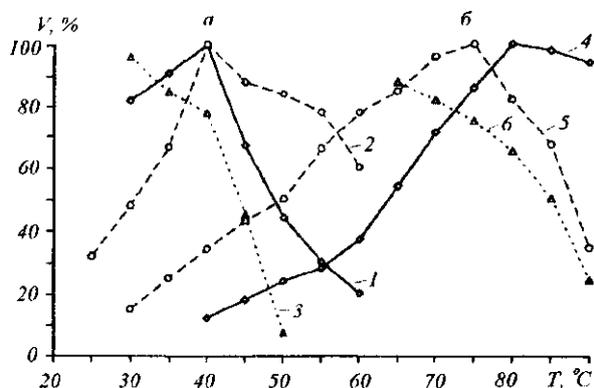


Рис. 6. Термостабильность и температурные зависимости скоростей реакций пирофосфатного обмена и аминоацилирования для тирозил-тРНК синтетаз из *E. coli* (а) и *T. thermophilus* (б): 1, 4 — скорость АТР-[<sup>32</sup>Р] пирофосфатного обмена; 2, 5 — скорость аминоацилирования тРНК; 3, 6 — термостабильность

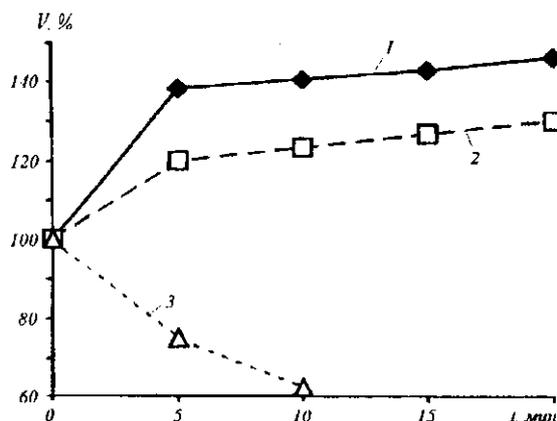


Рис. 7. Защита тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* от термоинактивации при 77 °С суммарной тРНК из *T. thermophilus* (1) и суммарной тРНК из *E. coli* (2); 3 — термоинактивация свободной тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* при 77 °С

ной області, где не происходило полной термоденатурации фермента и соответственно плавления тРНК.

Полученные результаты важны для понимания и оценки основных факторов термостабильности ферментов. Показано, что средство низкомолекулярных субстратов (L-тирозина и АТР) выше в случае термофильной тирозил-тРНК синтетазы по сравнению с мезофильной.

С другой стороны, сравнение кривых температурной зависимости термостабильности и пирофосфатного обмена тирозил-тРНК синтетазы из *T. thermophilus* указывает на значительное увеличение термостабильности фермента в присутствии низкомолекулярных субстратов (L-тирозина и АТР). Это позволило нам предположить, что защита ферментов их гомологичными субстратами в клетках термофильных бактерий является одним из факторов, обеспечивающих их стабильность при высоких температурах. Проверка данного предположения является предметом наших дальнейших структурно-функциональных исследований ферментов из *T. thermophilus*.

С. П. Егорова, Г. Д. Яремчук, М. А. Тукало

Порівняльне вивчення фізико-хімічних властивостей тирозил-тРНК синтетаз із *Thermus thermophilus* і *Escherichia coli*

Резюме

У роботі порівняно фізико-хімічні властивості тирозил-

тРНК синтетаз (КФ 6.1.1.1) із *T. thermophilus* і *E. coli*. Визначено величини констант Міхаеліса для тРНК<sup>Тyr</sup> із мезофіла і термофіла, L-тирозину і АТР в реакціях аміноацилювання тирозил-тРНК синтетазою із *T. thermophilus* при 37, 65 і 75 °С, оптимальні концентрації КСl в реакціях перехресного аміноацилювання. Здійснено порівняльний аналіз амінокислотного складу термофільної і мезофільної тирозил-тРНК синтетаз. Отримано температурні залежності швидкостей реакцій АТР-[<sup>32</sup>P]пірофосфатного обміну і аміноацилювання тРНК, температурні залежності термостабільності обох ферментів.

S. P. Egorova, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo

Comparative study of the physical and chemical properties of the tyrosyl-tRNA synthetases from *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli*

Summary

A comparative study of the physical and chemical properties of the tyrosyl-tRNA synthetases from *T. thermophilus* and *E. coli* has been carried out.  $K_M$  values for tRNA<sup>Tyr</sup> from *T. thermophilus* and *E. coli*, for L-tyrosine and ATP, as well as their temperature dependences were determined. The KCl effects were studied for the aminoacylation of the homologous tRNA<sup>Tyr</sup> and heterologous tRNA<sup>Tyr</sup> species. A comparative analysis of amino acid composition of the tyrosyl-tRNA synthetases from *T. thermophilus* and *E. coli* has been carried out. Temperature dependences of tRNA aminoacylation and [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub>-ATP exchange rates and the thermostability curves for tyrosyl-tRNA synthetases from *T. thermophilus* and *E. coli* were determined.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Яремчук А. Д., Тукало М. А., Егорова С. П. и др. Выделение тирозил-тРНК синтетазы из *Thermus thermophilus* НВ-27 // Укр. биохим. журн.—1990.—62, № 2.—С. 97—99.
2. Calendar R., Berg P. Purification and physical characterization of tyrosyl ribonucleic acid synthetases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Biochemistry.—1966.—5, N 5.—P. 1681—1690.
3. Calendar R., Berg P. The catalytic properties of tyrosyl ribonucleic acid synthetases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Ibid.—P. 1690—1695.
4. Jakes R., Fersht A. R. Tyrosyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. Stoichiometry of ligand binding and half-of-the-sites reactivity in aminoacylation // Ibid.—1975.—14, N 15.—P. 3344—3357.
5. Koch G. L. E. Tyrosyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*. Preparation and properties of the crystallizable enzyme // Ibid.—1974.—13, N 11.—P. 2307—2312.
6. Bhat T. N., Blow D. M., Brick P., Nyborg J. Tyrosyl-tRNA synthetase forms a mononucleotide-binding fold // J. Mol. Biol.—1982.—158, N 2.—P. 699—709.
7. Brick P., Bhat T. N., Blow D. M. Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate // Ibid.—1989.—208, N 1.—P. 83—98.
8. Brungraber E. F. A simplified procedure for the preparation of «soluble» RNA from rat liver // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1962.—8, N 1.—P. 1—3.
9. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики.—М.: Мир, 1979.—280 с.

10. Leatherbarrow R. J. Using linear and non-linear regression to fit biochemical data // Trends Biochem. Sci.—1990.—15.—P. 455—458.
11. Bobkova E. V., Gedrovitch A. V., Ankilova V. N. et al. Comparative study of the phenylalanyl-tRNA synthetases from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* by the tritium topography method // Biochem. Int.—1990.—20, N 5.—P. 1001—1009.
12. Fujinaga M., Berthet-Colominas C., Yaremchuk A. D. et al. Refined crystal structure of the seryl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* at 2.5 Å resolution // J. Mol. Biol.—1993.—234, N 1.—P. 222—233.
13. Wrba A., Schweiger A., Schultes V. et al. Extremely thermostable D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the eubacterium *Thermotoga maritima* // Biochemistry.—1990.—29, N 33.—P. 7584—7592.
14. Ankilova V. N., Reshetnikova L. S., Chernaya M. M., Lavrik O. I. Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* HB 8. Purification and properties of the crystallizing enzyme // FEBS Lett.—1988.—227, N 1.—P. 9—13.
15. Chlumecka V., Mitra S. K., D'Obrenan P., Smith C. J. Differences in the thermal inactivation properties of lysyl and arginyl transfer ribonucleic acid synthetases of bakers' yeast // J. Biol. Chem.—1970.—245, N 9.—P. 2241—2246.
16. Tscherner J. S., Lanks K. W., Salim P. D. et al. Studies on rat liver phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetase. Further purification, substrate specificity, and effects of substrates on heat inactivation // Ibid.—1973.—248, N 11.—P. 4052—4059.
17. Fersht A. R., Knill-Jones J. W., Bedouelle H., Winter G. Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase; a mobile loop envelops the transition state in an induced-fit mechanism // Biochemistry.—1988.—27.—P. 1581—1587.

Поступила в редакцию 17.07.97