

БАКТЕРІАЛЬНА ЕКСПРЕСІЯ ТА $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ІЗОТОПНЕ МІЧЕННЯ ЦИТОКІНПОДІБНОГО СООН-КІНЦЕВОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ДЛЯ ЯМР-ДОСЛІДЖЕНЬ

СООН-кінцевий модуль цитоплазматичних тирозил-тРНК синтетаз (ТирРС) ссавців, який відповідає ділянці V363-S528 поліпептидного ланцюга, в ізольованому стані проявляє цитокінподібні властивості. З метою дослідження 3D структури цитокінподібного С-модуля в розчині методом спектроскопії ядерного магнітного резонансу (ЯМР) його було клоновано в експресуючому векторі pET-30a у вигляді рекомбінантного білка YCD3k, експресовано у клітинах *Escherichia coli* штаму BL21(DE3) на мінімальному середовищі з міченням по ізотопах ^{13}C та ^{15}N і очищено в препаративних кількостях. Отримано двоіріні $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ЯМР-спектри, які показують значну дисперсію сигналів ЯМР.

Вступ

Тирозил-тРНК синтетази (ТирРС) є важливими гомодимерними ензимами дорибосомного етапу біосинтезу білка і каталізують високоспецифічну реакцію приєднання амінокислоти L-тирозину до відповідних тРНК^{Tyr}. Послідовність цитоплазматичної ТирРС ссавців (бик, *Bos taurus*) та її СООН-кінцевого модуля була секвенована нами раніше по її кДНК [1, 2], і схему доменної організації та амінокислотну послідовність бичачої ТирРС показано на рис. 1. Кожна з субодиниць містить 528 а. з. і складається з NH_2 -кінцевого модуля, який зумовлює enzymaticну активність ферменту та додаткового некаталітич-

ного С-модуля, з'єднаних міжмодульним лінкером. С-модуль відповідає ділянці V363-S528 і, в свою чергу, складається з еволюційно давнього ОВ-фолд-вмісного домену та злитого з ним А-субдомену [3].

С-модуль ТирРС ссавців має спорідненість до РНК, зокрема тРНК, а також виконує неканонічну цитокін ЕМАР II-подібну функцію після обмеженого протеолітичного розщеплення ТирРС *in vivo* [4–7]. Вивчення цитокінподібної активності С-модуля має великий практичний інтерес, оскільки дає змогу зробити припущення про наявність системи, яка дублює клітинні ефекти гомологічного цитокіну ЕМАР II ссавців, що є досить характерним для функціонування мережі

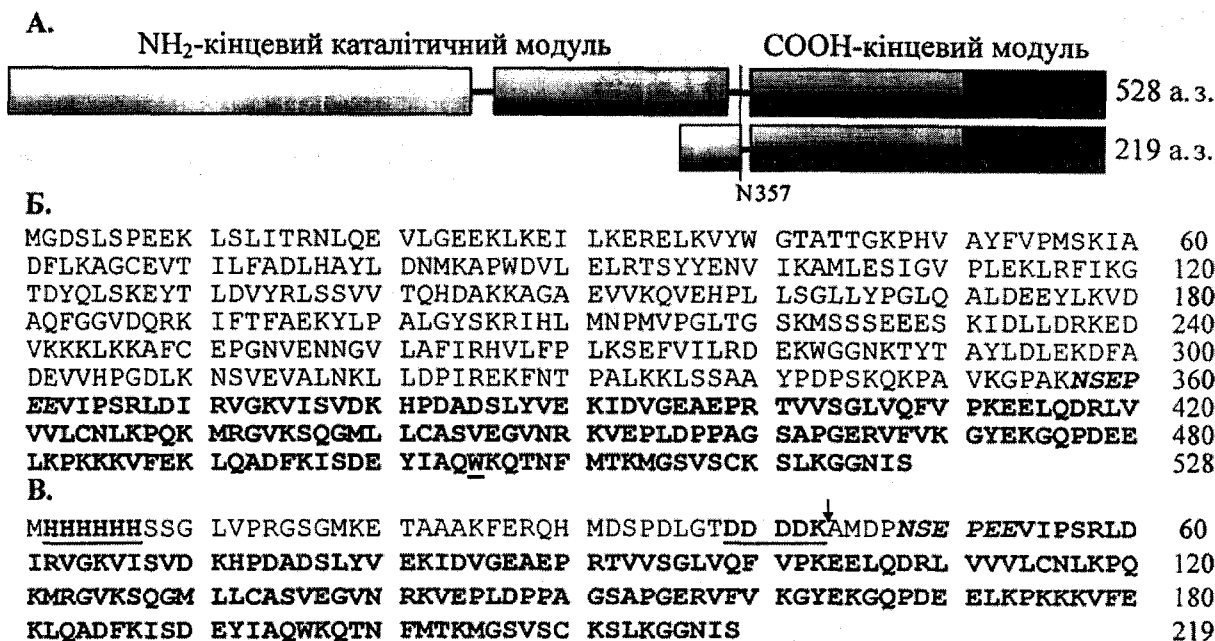


Рис. 1. А. Схема доменної організації субодиниці цитоплазматичної тирозил-тРНК синтетази бика. Б. Амінокислотна послідовність субодиниці ТирРС бика. Клоновану послідовність С-модуля виділено напівжирним шрифтом. В. Амінокислотна послідовність рекомбінантного білка YCD3k, перші 43 а. з. якого кодуються вектором рЕТ-30а і містять, зокрема, His₆-tag та сайт розщеплення ентерокиназою DDDDK↓ (підкреслено). Єдиний залишок триптофану Trp196 білка YCD3k також підкреслено

цитокінів. Як і EMAP II, С-модуль може брати участь у регуляції взаємодії пухлина-хазяїн, васкуляризації, ембріогенезі та апоптозі. Дослідження цитокін-подібної активності С-модуля та залучення ТирРС ссавців в онкогенез і запальні процеси потенційно може бути основою для розробок нового покоління антипухлинних препаратів та підходів до лікування онкологічних захворювань і гострих запальних процесів.

Раніше С-модуль ТирРС бика було нами окремо клоновано в експресуючому векторі рЕТ-30а у вигляді рекомбінантного білка YCD3k (рис. 1В), який містить з N-кінця додаткові 43 а. з., що кодуються цим вектором, та фрагмент міжмодульного лінкера ТирРС (ділянка N357-E362) [4, 5]. З використанням методу моделювання за гомологією було побудовано дві моделі просторової структури С-модуля, які базувались на кристалографічних структурах гомологічних білків: домені В2 еубактеріальної фенілаланіл-тРНК синтетази (23 % ідентичності) [8] та цитокіні EMAP II людини (52,7 % ідентичності, неопубліковані дані).

Для експериментальної перевірки цих моделей перспективним є використання методу ЯМР-спектроскопії, який на сьогодні є основним методом для визначення 3D структури глобулярних білків з молекулярною масою до 25–30 кДа у водних розчинах [9]. Використовуючи методику

селективного подвійного мічення ізотопами ¹³C і ¹⁵N, можна отримати препарат міченого білка та після віднесення окремих сигналів ЯМР-спектра білка реконструювати його тривимірну структуру у водному розчині. Метою даної роботи було дослідження рекомбінантного С-модуля, міченого одним або обома ізотопами ¹³C та ¹⁵N з використанням експресії в мінімальному середовищі, де джерелом вуглецю і азоту є, відповідно, [¹³C]-глюкоза і [¹⁵N]-NH₄Cl, та попередній аналіз 2D ЯМР-спектрів.

Матеріали та методи

Амінокислотна послідовність цитоплазматичної ТирРС бика була визначена нами раніше і депонована в GenBank/GenPept (код AAC82467) і Swiss-Prot (код Q29465). Основні фізико-хімічні властивості білка YCD3k було розраховано і передбачено з використанням програми ProtParam при сервері ExPASy (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>).

У роботі були використані клітини *E. coli* штаму BL21(DE3) та вектор для бактеріальної експресії рЕТ-30а («Novagen», США), який містить селективний ген стійкості до антибіотика канаміцину. Ni-NTA-агароза («Qiagen», США).

Мінімальне середовище А (на 100 мл): 10[×] M9 солі 10 мл; [¹⁵N]-NH₄Cl 50–70 мг; 100[×] розчин

мікроелементів 1 мл; 2 М $MgSO_4$ 100 мкл; 1 М $CaCl_2$ 10 мкл; [^{13}C]-глюкоза 200 мг; 1мг/мл біотин 100 мкл; 50 мг/мл тіамін 2 мкл; 30 мг/мл канаміцин 100 мкл. Агаризоване (1,5 %) середовище А готувалося додаванням 1,5 г агару на 100 мл рідкого середовища. Солі середовища М9 (наважки на 1 л): Na_2HPO_4 60 г; $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ 91 г; KH_2PO_4 30 г; $NaCl$ 5 г.

Компетентні клітини *E. coli* штаму BL21(DE3) було трансформовано плазмідом рЕТ-30а/YCD3 та висіяно на чашку Петрі з агаризованим мінімальним середовищем А, яке містило 30 мкг/мл антибіотика канаміцину. По одній з колоній, які вирости впродовж ночі, додавали в кінчні колби зі 100 мл середовища А, до складу якого входила [^{13}C]-глюкоза та [^{15}N]-хлорид амонію. Ріст біомаси проводили при 37 °С протягом 12 год в установці для культивування клітин УВМТ-12-250. Після досягнення оптичної густини $OD_{600} = 0,6-0,8$ проводили індукцію транскрипції гена цільового білка шляхом додавання розчину IPTG до кінцевої концентрації 1 мМ. Інкубацію проводили протягом 3–5 год при 37 °С. Клітини осаджували центрифугуванням при 4500 об./хв протягом 15 хв на центрифугі «К-23», і осад заморожували при –20 °С.

Для отримання клітинного лізату осад розморозили, і всі подальші операції проводили при 0 °С на льодовій бані. Лізис клітин проводили у 15 мл буферного розчину: 30 мМ трис-НСІ, рН 8,0; 500 мМ $NaCl$; 10 мМ імідазолу. Отриману гомогенну суспензію озвучували на ультразвуковому сонікаторі 5 разів по 10 с та центрифугували у пластикових мікропробірках («епендорфах») при 6000 g (12000 об./хв) 2 рази по 15 хв на мікроцентрифугі «Sigma 1-13».

Афінна хроматографія на Ni-NTA-агарозній колонці. Супернатант, отриманий після центрифугування (клітинний екстракт), наносили на Ni-NTA-агарозну колонку об'ємом 1,5 мл, врівноважену буфером для лізису. Всі операції проводили при швидкості потоку 0,4 мл/хв. Далі проводили ретельну промивку колонки 20 об'ємами колонки (30 мл) того ж буфера. Цільовий білок отримували після елюції трьома об'ємами буфера для елюції: 30 мМ Трис-НСІ, рН 8,0; 300 мМ $NaCl$; 100 мМ імідазол. Об'єм фракцій становив 0,7 мл. Колонку відмивали і регенерували відповідно до методики. Фракції білка об'єднували і проводили їх діаліз проти 30 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 8,0; 150 мМ $NaCl$. Концентрацію препаратів білка визначали по спектрах УФ-поглинання та методом Бредфорда. Остаточне концентрування препаратів проводили на мікроконцентраторах «Centrispin» (США) згідно з

інструкцією. Перевірку чистоти отриманих препаратів білка YCD3k проводили методом електрофорезу у денатуруючих умовах при наявності додецилсульфату натрію в 12,5 %-му поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) за Laemmli [11]. Як маркерні білки використовували бичачий сировотковий альбумін (67 кДа), овальбумін (45 кДа) та цитохром С (12,5 кДа).

Спектри ЯМР записували на спектрометрі «Varian UnityPlus 500 MHz».

Результати та їх обговорення

З метою визначити 3D структуру С-кінцевого модуля тирозил-тРНК синтетази бика цим методом проводили оптимізацію протоколу отримання мічених по ізотопах ^{13}C і ^{15}N препаратів рекомбінантного білка. Основними вимогами до препаратів для ЯМР-спектроскопії є: наявність білка у нативній конформації, а також у гомогенній, монодисперсній, неагрегованій формі, з концентрацією порядку 10–20 мг/мл і об'ємом не менше ніж 300 мкл. У цих препаратах не повинно бути парамагнітних іонів та органічних домішок.

З використанням технології рекомбінантних ДНК було клоновано С-кінцевий модуль цитоплазматичної тирозил-тРНК синтетази бика у вигляді конструкції рЕТ-30а/YCD3. Білок YCD3k містить на N-кінці специфічну послідовність довжиною 43 а. з., яка кодується вектором і містить гексагістидинову послідовність (His₆-tag), що дає змогу проводити очищення цього білка в одну стадію, застосовуючи метод афінної метал-хелатуючої хроматографії. Фізико-хімічні властивості рекомбінантного С-модуля ТирРС, виведені та передбачені програмою ProtParam, становлять: довжина послідовності 219 а. з., молекулярна маса 24,256 кДа, теоретичне значення ізоелектричної точки $pI = 6,25$, сумарна формула $C_{1059}H_{1704}N_{300}O_{329}S_{11}$, повна кількість атомів 3403, коефіцієнт молярної екстинкції при 280 нм становить $9530 M^{-1}cm^{-1}$, а поглинання 0,1 %-го розчину становить 0,393.

Отримання препаратів білка YCD3k, міченого по ізотопах ^{13}C та ^{15}N . Рекомбінантний С-модуль отримували шляхом експресії у бактеріальній системі відповідної конструкції рЕТ-30а/YCD3 у мінімальному середовищі А. Експресію проводили у 100 мл суспензії клітин *E. coli* штаму DL21(DE3) з подальшим очищенням цільового білка методом афінної метал-хелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою. Отримано препарати рекомбінантного білка YCD3k, міченого по ізотопах ^{13}C і ^{15}N , для дослідження його властивостей методом ЯМР-спектроскопії.

Аналіз препаратів білка YCD3k проводили методом гель-електрофорезу у денатуруючих умовах, який показав їх гомогенність і чистоту не менше як 98 %. Вихід білка становив 3–4 мг із 100 мл суспензії клітин *E. coli*, що є досить високим виходом для цієї системи експресії [10]. При цьому білок є розчинним і не утворює нерозчинних агрегатів. Високий вихід білка свідчить про відсутність таких небажаних проблем білкової експресії, як токсичність білка для клітин *E. coli*, нестабільність білка, неправильний процесинг або посттрансляційна модифікація та неефективна трансляція. Препарати білка YCD3k мали концентрацію 5–10 мг/мл і добре витримували інтенсивний діаліз, який проводили для вилучення імідазолу і органічних домішок проти 30 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 8,0; 150 мМ NaCl та подальше концентрування на мікроконцентраторах.

Проведено оптимізацію умов для експресії та очищення білка YCD3k з метою підвищити вихід і ступінь чистоти цільового білка, а також отримати його у вигляді розчинного білка з нативною конформацією. Для зменшення неспецифічного зв'язування інших білків *E. coli* до Ni-NTA-агарози під час хроматографії нами встановлено особливу важливість високої концентрації NaCl (не нижче 500 мМ).

Раніше нами показано, що власна флуоресценція білка YCD3k відповідає максимуму 327 нм, що свідчить про занурену конформацію єдиного

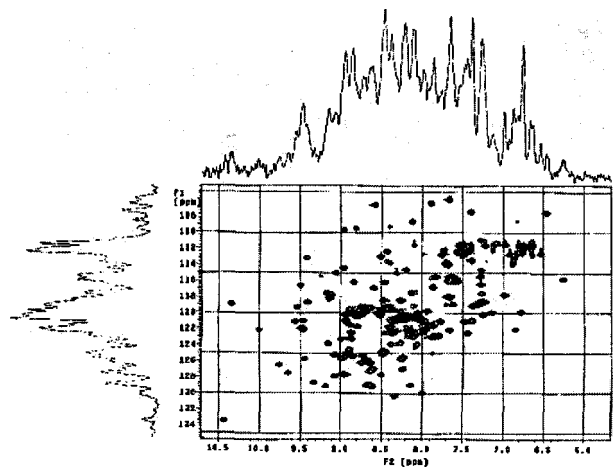


Рис. 2. Спектр ЯМР С-модуля тирозил-тРНК синтетази, міченого ізотопами ^{13}C і ^{15}N

залишка триптофану Trp196 у білковій глобулі і є критерієм нативного стану білка [14]. Усі отримані препарати за цим критерієм містили нативний білок.

Отримано 2D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ЯМР-спектри препаратів білка YCD3k, мічених обома ізотопами ^{13}C і ^{15}N у натрій-фосфатному буфері, рН 8,0 (рис. 2). Аналіз отриманих спектрів виявляє значну дисперсію окремих сигналів ЯМР (див. рис. 2). Це в принципі дає змогу провести віднесення сигналів до окремих груп у структурі поліпептидного ланцюга білка та реконструювати тривимірну структуру С-модуля у водному розчині.

1. Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х., Корнелюк А. И. Клонирование кДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, с использованием ПЦР-амплифицированного радиоактивно меченного гибридизационного зонда // Биополимеры и клетка.- 1997.- Т. 13, № 2.- С. 121-126.
2. Корнелюк А. И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка.-1998.-Т. 14, № 4.- С. 349-359.
3. Леванец О. В., Найденов В. Г., Одынец К. А., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х., Корнелюк А. И. Гомология С-концевого некаталитического домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих с цитокином ЕМАР II и некаталитическими доменами мстонилин- и фенилаланил-тРНК синтетаз // Биополимеры и клетка.- 1997.- Т. 13, № 6.- С. 474-478.
4. Дубровский А. Л., Савинская Л. А., Корнелюк А. И. Клонирование и бактериальная экспрессия цитокиноподобного некаталитического домена бычьей тирозил-тРНК синтетазы // Биополимеры и клетка.- 1998.- Т. 14, № 5.- С. 449-452.
5. Kornelyuk A. I., Tas M., Dubrovsky A., Murray C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase II Биополимеры и клетка.- 1999.-Т. 15, № 2.- С. 168-172.
6. Wakasugi K., Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase II J. Biol. Chem.- 1999.- V. 274, № 33.- P. 23155-23159.
7. Wakasugi K., Slike B. M., Hood J., Otani A., Ewalt K. L., Friedlander M., Cheresch D. A., Schimmel P. A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis II Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.-2002.- V. 99, № 1.-P. 173-177.
8. Голуб А. Г., Одынец К. А., Ныпорко А. Ю., Корнелюк А. И. Моделирование пространственной структуры С-концевого цитокин-подобного модуля цитоплазматической тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка.- 2000.- Т. 16, №. 6.- С. 515-524.
9. Gunter P. Structural calculations of biological macromolecules from NMR data II Quat. Rev. Biophys.- 1998.- V. 31, № 2.- P. 145-237.
10. Novagen pET System Manual, 10th Edition (http://www.novagen.com/SharedImages/Technical-Literature/7_tb05_5.pdf).
11. QIAexpress Detection and Assay Handbook (<http://www.qiagen.com/literature/xpresslit.asp#qiexpress>).
12. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 II Nature.- 1970.- V. 227, № 259.- С 680-685.
13. Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H, Fan Y. G., Godman G., Familletti P. C, Wang F, Pan Y. C Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms II J. Biol. Chem.- 1992.- V. 267, № 28.- P. 20239-20247.
14. Кордыш М. А., Одынец К. А., Корнелюк А. И. Характеристика триптофановой флуоресценции С-модуля тирозил-тРНК синтетазы // Биополимеры и клетка.- 2003 (друкується).

D. Gerasimchuk, K. Odynets, I. Jukov, A. Kornelyuk

**BACTERIAL EXPRESSION AND $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ISOTOPE LABELING
OF CYTOKINE-LIKE COOH-TERMINAL MODULE OF TYROSYL-tRNA
SYNTHETASE FOR NMR INVESTIGATION**

COOH-terminal module of cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase of mammals, which corresponds to V363-S528 region of polypeptide chain, displays cytokine-like properties in isolated state. With the aim of 3D structure determination by NMR spectroscopy in solution, the C-module was cloned in pET-30a expression vector as a recombinant YCD3k protein and expressed in Escherichia coli, BL21 (DE3) strain in the minimal media with the labeling by ^{13}C and ^{15}N and purified at the preparative scale. The 2D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ NMR spectra were measured which revealed a significant dispersion of NMR signals.