



УДК 547.963.32.04+577.157.6

КИНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА
ФЕРМЕНТАТИВНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ тРНК

Галбарян А. С., Морозов И. А., Венкстери Т. В.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Козлов Л. В.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Исследована кинетика метилирования индивидуальных тРНК (серниновой и аспарагиновой из дрожжей и валиновой, фенилаланиновой, формилметпониновой и глутаминовой из *E. coli*), очищенной в 2000 раз *m'A*-метилазой из *Thermus flavus*. Для всех тРНК, кроме тРНК₂^{Glu}, наблюдается субстратное ингибирование при концентрации тРНК выше некоторой величины (от 3 до 30 мкМ для разных тРНК). Для тРНК^{Ser} проведен детальный кинетический анализ, результаты которого позволили высказать предположение о том, что субстратное ингибирование объясняется упорядоченным механизмом присоединения субстратов, при котором комплексы тиа метилаза – тРНК и метилаза – S-аденозилгомоцистеин – тРНК непродуктивны.

Метилирование тРНК осуществляется путем переноса метильной группы S-аденозил-L-метионина на некоторые нуклеотидные остатки полинуклеотидной цепи метилтрансферазами (КФ 2.1.1) [1]. Исследования кинетики ферментативного метилирования [2–6] не дали однозначного результата относительно механизма этой реакции. Так, Шугарт [3], Кале и Крегер [4] полагают, что эта двухсубстратная реакция характеризуется отсутствием определенной последовательности присоединения субстратов и отщепления продуктов реакции, Лебой и Глик [5] обнаружили субстратное активирование при возрастании концентрации тРНК, а Иззо и др. [6] наблюдали ингибирование реакции высокими концентрациями тРНК, что может свидетельствовать в пользу вынужденного механизма, т. е. упорядоченного присоединения субстратов и упорядоченного отщепления продуктов реакции метилирования.

Неоднозначность имеющихся в литературе данных может объясняться как использованием различных ферментов, выделяемых из разных источников и, возможно, различающихся механизмом действия, так и проведением в ряде случаев кинетических экспериментов не с индивидуальными субстратами, а с суммарными препаратами транспортных РНК, каждая из которых может характеризоваться своими кинетическими константами.

Для исследования кинетики метилирования тРНК мы выбрали *m'A*-метилтрансферазу из термофильного микроорганизма *Thermus flavus*, которую удалось получить в высокоочищенном состоянии, и несколько индивидуальных тРНК.

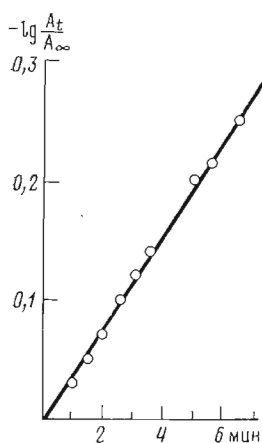


Рис. 1

Рис. 1. Включение $^{14}\text{CH}_3$ -группы в $\text{tRNA}_2^{\text{Glu}}$ при инкубации с $m'A$ -метилазой в присутствии S -аденозил $^{14}\text{CH}_3$ метионина. A_t — радиоактивность tRNA в момент времени t . A_∞ — предельно достижимая радиоактивность при включении одной $^{14}\text{CH}_3$ -группы на моль tRNA

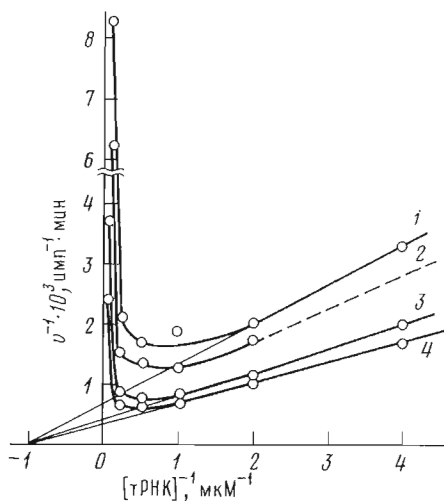


Рис. 2

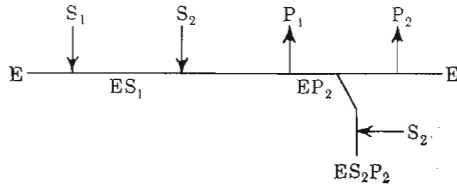
Рис. 2. График Лайпувера — Берка для кинетики метилирования tRNA^{Sec} при постоянных концентрациях S -аденозилметионина: 1 — 5; 2 — 10; 3 — 20; 4 — 40 μM

Ранее было установлено, что метилтрансферазы образуют комплексы как с метилированной и неметилированной tRNA , так и с S -аденозилметионином в отсутствие tRNA [7, 8]. Следовательно, трудно ожидать строгой упорядоченности присоединения субстратов ферментом в том смысле, что субстрат, связывающийся вторым, не мог бы вообще образовывать с ферментом двойного комплекса. В исследовании кинетики метилирования мы использовали S -аденозил $^{14}\text{CH}_3$ метионин и измеряли радиоактивность tRNA в результате включения в нее $^{14}\text{CH}_3$ -групп. При использовании низких концентраций tRNA трудно регистрировать низкую степень метилирования tRNA и таким образом измерять начальные скорости реакции.

Согласно рис. 1, метилирование tRNA подчиняется кинетике реакции первого порядка. Поэтому для определения начальной скорости реакции и расчета константы скорости в случае низких концентраций tRNA измерения иногда проводились при высоких степенях превращения субстрата, поскольку расчет может быть осуществлен по любой точке временной зависимости скорости реакции метилирования.

Исследование кинетики реакции метилирования tRNA^{Sec} $m'A$ -метилазой выявило выраженное субстратное ингибирование tRNA . Используемый в настоящей работе препарат сериновой tRNA не является гомогенным и представляет собой смесь двух tRNA , структурно различающихся тремя нуклеотидными остатками. Такая неоднородность субстрата, однако (как это будет видно из дальнейшего изложения), не помешала получить характерную кинетическую картину, позволяющую прийти к определенным выводам относительно механизма реакции.

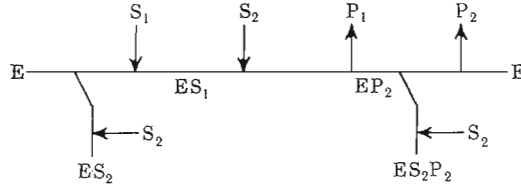
Субстратное ингибирование может проявляться при неправильном связывании в активном центре фермента двух молекул tRNA , что трудно было допустить в этом случае, если учесть большой размер субстрата, сравнимый с размером молекулы фермента (по нашим данным, $M \sim 70\,000$, что близко к величине, полученной для $m'A$ -метилазы из печени крысы [9]). Другой механизм субстратного ингибирования может быть в соответствии с теорией Клиланда [10] схематически представлен в виде следующей схемы двухсубстратной реакции:



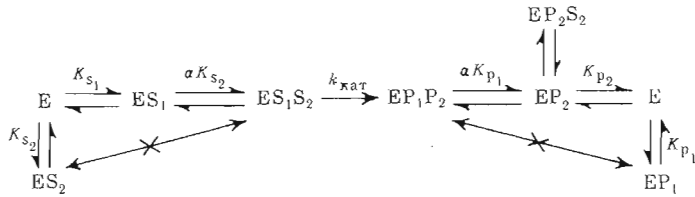
где S_1 и S_2 — субстраты, а P_1 и P_2 — продукты реакции в порядке соответственно присоединения и диссоциации.

Применительно к нашему случаю это означает, что сначала фермент связывает S -аденозилметионин, затем присоединяет тРНК; после осуществления трансметилирования первой уходит метилированная тРНК, а затем отщепляется S -аденозилгомоцистеин. Если до отщепления S -аденозилгомоцистеина к двойному комплексу присоединяется неметилированная тРНК, то образуется непродуктивный комплекс, что и приводит к субстратному торможению реакции.

Как уже указывалось выше, в случае метилтрансфераз оба субстрата могут образовывать двойные комплексы с ферментом. Поэтому в нашем случае схема может выглядеть несколько сложнее:



т. е. тРНК, присоединившаяся к ферменту в первую очередь, может препятствовать связыванию S -аденозилметионина, и при высоких концентрациях тРНК должно наблюдаться субстратное торможение. Эту же схему можно представить следующим образом:



где K_{s_1} , K_{s_2} — соответствующие константы диссоциации фермент-субстратных комплексов, а коэффициент α показывает различие в константах диссоциации S_2 из двойного и тройного комплексов. Для вывода уравнения начальной скорости реакции допустим, что $\alpha=1$, $K_{s_1}=K_{p_2}$ и $K_{s_2}=K_{p_1}$. Подставив в уравнение для скорости двухсубстратной реакции с учетом обратной реакции [11] $[S_2]$ вместо $[P_1]$ (поскольку тРНК может «занимать место» метилированной тРНК) и значение $[P_2]$ для начального момента, равное 0, получим следующее уравнение скорости:

$$v = \frac{V [S_1] [S_2]}{K_{s_1}K_{s_2} + [S_1]K_{s_2} + 2[S_2]K_{s_1} + 2[S_1][S_2] + [S_1][S_2]^2/K_{s_2}}$$

или в двойных обратных величинах:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[S_1][S_2]} \cdot \frac{K_{s_1}K_{s_2}}{V} + \frac{1}{[S_1]} \cdot \frac{2K_{s_1}}{V} + \frac{2}{V} + \frac{[S_2]}{VK_{s_2}}$$

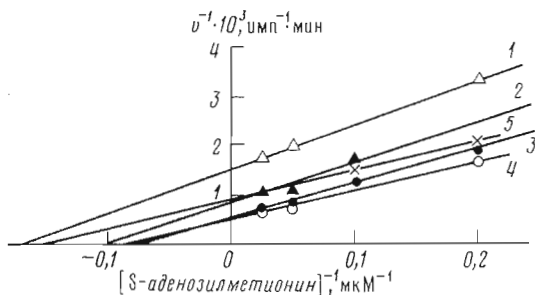


Рис. 3. График Лайнуивера — Берка для кинетики метилирования тРНК^{Ser} при постоянных концентрациях тРНК: 1 — 0,25; 2 — 0,5; 3 — 1; 4 — 2; 5 — 4 мкМ

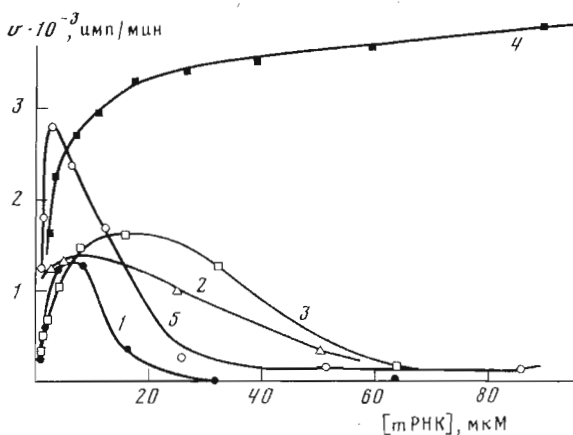


Рис. 4. Зависимость скорости метилирования индивидуальных тРНК от концентрации субстрата: 1 — тРНК^{Val}, 2 — тРНК^{Phe}, 3 — тРНК^{Met}, 4 — тРНК^{Glu} из *E. coli*, 5 — тРНК^{Asp} из дрожжей

При построении зависимостей в координатах Лайнуивера — Берка при постоянных концентрациях S_1 , т. е. аденозилметионина, кривые должны при приближении к оси ординат круто подниматься, асимптотически приближаясь к вертикальной оси. В эксперименте действительно наблюдается такая картина (см. рис. 2). При экстраполяции линейных участков кривых для низких концентраций тРНК пучок прямых пересекается на оси абсцисс в точке, соответствующей значению $-2/K_{s_2}$. Согласно рис. 2, значение K_{s_2} (для тРНК) равно 2 мкМ.

Кинетический анализ реакции в координатах Лайнуивера — Берка показывает, что в соответствии с предложенным механизмом зависимость скорости реакции от концентрации S-аденозилметионина при постоянных значениях $[S_2]$ (концентрации тРНК) должна выражаться серией прямых, не пересекающихся в одной общей точке. При увеличении $[S_2]$ каждая последующая прямая будет иметь меньший наклон, чем предыдущая, а отрезки, отсекаемые на оси ординат, должны вначале уменьшаться, а затем расти. Прямая, лежащая выше всех, т. е. отсекающая наименьший отрезок на оси ординат, соответствует $[S_2] = K_{s_2}$. Действительно, характер прямых (рис. 3), полученных в эксперименте, в точности соответствует предсказанному теории. Самая нижняя прямая соответствует концентрации тРНК, равной 2 мкМ, т. е. значению K_{s_2} , как это и следовало из графика на рис. 2.

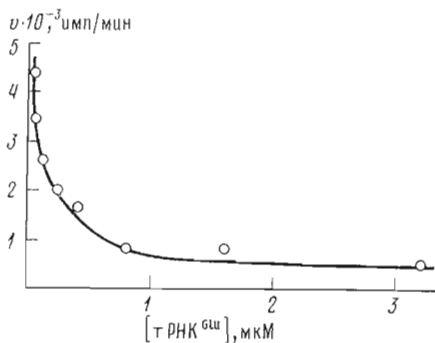


Рис. 5. Зависимость скорости метилирования тРНК₂^{Glu} от концентрации тРНК ферментом из нефромы крысы. Образование 5-метилцитидина определяли хроматографически после гидролиза тРНК [15]

Таким образом, полное совпадение данных эксперимента и теории позволяет высказать предположение о наличии упорядоченного механизма при ферментативном метилировании тРНК^{Ser} m'A-метилазой.

При рассмотрении возможных причин субстратного ингибирования мы сочли маловероятной возможность образования ферментом комплекса с двумя молекулами тРНК. Кинетика процесса также не свидетельствует в пользу такой возможности. Так, в случае связывания двух молекул тРНК при построении графиков в координатах Лайнуивера — Берка (см. рис. 2) прямые должны пересекаться на оси абсцисс в точке, соответствующей значению $-1/K_{s2}$, а не $-2/K_{s2}$, как в наблюдаемом нами случае. Значение K_{s2} , полученное в настоящей работе, свидетельствует в пользу упорядоченного механизма ферментативного метилирования.

Интересно, что авторы учебных пособий [12, 13] в качестве классического примера субстратного ингибирования с образованием комплекса фермента с двумя молекулами субстрата рассматривают ингибирование также одной из метилтрансфераз, а именно фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы, для которой 3,4-дихлорфенилэтаноламин является одновременно субстратом и ингибитором реакции трансметилирования [14]. В этом случае, по-видимому, следует учитывать, что эта реакция является двухсубстратной (второй субстрат — S-аденозилметонин), и нельзя исключить, что и эта метилтрансфераза функционирует по упорядоченному механизму.

Субстратное ингибирование было обнаружено нами также при метилировании m'A-метилазой других тРНК. Мы изучали метилирование суммарной субметилированной тРНК из *E. coli*, аспарагиновой тРНК из дрожжей, а также валиновой, фенилаланиновой, формилметиониновой и глутаминовой тРНК из *E. coli*. Для всех перечисленных тРНК, кроме последней, скорость реакции резко падала с ростом концентрации тРНК выше некоторой величины, варьирующей для разных тРНК от 3 до 30 мкМ. Только для глутаминовой тРНК нам не удалось заметить субстратного ингибирования (рис. 4).

При метилировании остатка цитидина-48 тРНК₂^{Glu} из *E. coli* метилазой из нефромы крысы образование 5-метилцитидина также было подвержено субстратному ингибированию (рис. 5). Такие же результаты были получены для ферментов из печени и гепатомы.

Таким образом, при исследовании кинетики метилирования тРНК для разных ферментов и разных субстратов были получены данные, говорящие в пользу упорядоченного механизма присоединения субстратов и отщепления продуктов реакции, выражающегося в невозможности присоединения S-аденозилметонина к двойному комплексу фермент — тРНК или ухода S-аденозилгомоцистеина из тройного комплекса до диссоциации из комплекса тРНК. Это явление может объясняться стерическими препятствиями, возникающими при образовании комплекса фермент — тРНК. Возможно, что в таком двойном комплексе доступность участка, связывающе-

го аденозилметионин, ограничена. В тех случаях, когда такой механизм кинетически не проявлялся (наши результаты с тРНК₂^{Glu} и *m*'А-метилазой; некоторые литературные данные), вероятнее всего, не было достигнуто состояние насыщения фермента тРНК (система с низким сродством). Возможно, что повышение концентрации тРНК позволило бы обнаружить субстратное торможение и в этих случаях.

Следует отметить, что полученные кинетические данные характеризуют именно упорядоченный механизм метилирования тРНК. Торможение субстратом при «пинг-понг»-механизме проявляется в других кинетических зависимостях (см. [10]). Отсутствие «пинг-понг»-механизма позволяет высказать предположение о том, что механизм трансметилирования состоит в прямом переносе метильной группы с донора (S-аденозилметионина) на тРНК и не включает промежуточного метилирования фермента.

Экспериментальная часть

Препарат суммарной субметилированной тРНК выделен из ауксотрофного по метионину штамма *E. coli* K-12 58161. тРНК₁₊₂^{Ser} из дрожжей получена от проф. Цахау (ФРГ), тРНК₂^{Glu} и тРНК^{Met} из *E. coli* — от проф. Кельмерса (США), а тРНК^{Val} и тРНК^{Phe} из *E. coli* и тРНК^{Asp} из дрожжей — от проф. Гросса (ФРГ). S-Аденозил[¹⁴СН₃]метионин, уд. акт. 54 Ки/моль — фирмы Amersham (Англия).

m'А-Метилазу выделяли из термофильного микроорганизма *Thermus flavus* методом аффинной хроматографии. Биомассу (10 г) растирали в ступке с окисью алюминия, белок элюировали 60 мл буфера 10 мМ трис-НСl — 5 мМ дитиотреит, рН 8,2, и центрифугировали 6 ч при 105 000g. Белок осаждали сульфатом аммония (43% насыщения), центрифугировали и осадок растворяли в 30 мл буфера: 10 мМ трис-НСl, 1 мМ дитиотреит, 20 мМ MgCl₂, 0,3 М СН₃COONH₄, рН 6,9 (буфер А). Полученный ферментный раствор, содержащий 150 мг белка, пропускали со скоростью 20 мл/ч через две последовательно соединенные колонки (4×2 см). Первая колонка содержала аминоксибутилцеллюлозу с иммобилизованной рРНК, вторая — аминоксибутилцеллюлозу с тРНК, иммобилизованной за окисленный 3'-концевой остаток [16]. Первую колонку отсоединяли, вторую промывали последовательно следующими буферами: 1) буфером А, 2) 10 мМ трис-НСl, 1 мМ дитиотреитом, 2 мМ MgCl₂, рН 8,2 (буфер Б), 3) 0,1 М NaCl в буфере Б. Фермент элюировали градиентом концентрации NaCl (от 0,1 до 0,3 М) в буфере Б, определяли метилазную активность во фракциях (см. ниже) и фракции с максимальной метилазной активностью объединяли и использовали для дальнейших опытов. Препарат представляет собой высокоочищенную *m*'А-метилазу с уд. акт. 5000—7000 ед. акт. на 1 мг белка.

За единицу ферментативной активности принято количество фермента, переносящее на тРНК 0,5 нмоль метильных групп за 30 мин при 70° С в инкубационной смеси, содержащей 10 мМ трис-НСl, 2 мМ MgCl₂, 30 мМ СН₃COONH₄, 100 мМ NaCl (рН 8,2), 25 мкМ S-аденозил[¹⁴СН₃]метионин и 25 мкМ суммарную субметилированную тРНК из *E. coli*.

Метилазную активность ферментных препаратов определяли в этих условиях, а в кинетических опытах варьировали тип тРНК, концентрации обоих субстратов и время реакции. Концентрация очищенного фермента в инкубационной смеси составляла 2 мкг/мл (14 ед. акт./мл). Время реакции в тех опытах, где оно не указано особо, составляло 5 мин.

Опыты с ферментом из тканей крысы проводили как описано ранее [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Fleissner E., Borek E. (1963) *Biochemistry*, 2, 1093—1100.
2. Nau F. (1976) *Biochimie*, 58, 629—645.
3. Shugart L. (1978) *Biochemistry*, 17, 1068—1072.

4. Kahle P., Kröger H. (1976) Abstr. 10th Int. Cong. of Biochem., p. 33.
5. Leboy P. S., Glick J. M. (1976) Abstr. 10th Int. Cong. of Biochem., p. 33.
6. Izzo P., Cimino F., Cortese R., Salvatore F. (1974) Abstr. Comm. 9th FEBS Meet., p. 191.
7. Gambaryan A. S., Morozov I. A., Venkstern T. V., Bayev A. A. (1979) Nucl. Acids Res., 6, 1001-1011.
8. Izzo P., Gantt R. (1977) Biochemistry, 16, 3576-3581.
9. Glick J. M., Leboy P. S. (1977) J. Biol. Chem., 252, 4790-4795.
10. Cleland W. W. (1970) The Enzymes, 3 ed., 2, 1-65.
11. Cleland W. W. (1963) Biochim. et biophys. acta, 67, 104-137.
12. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, с. 127-128, Изд-во МГУ.
13. Березин И. В., Мартинек К. (1977) Основы физической химии ферментативного катализа, с. 235, «Высшая школа», М.
14. Fuller R. W., Marsh M. M. (1972) J. Med. Chem., 15, 1068-1069.
15. Гамбарян А. С., Венкстern Т. В., Баев А. А. (1976) Молекулярн. биология, 10, 846-856.
16. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М., Гамбарян А. С., Морозов И. А., Венкстern Т. В. (1978) Молекулярн. биология, 12, 1105-1111.

Поступила в редакцию
3.XII.1979

KINETIC STUDIES ON THE MECHANISM OF tRNA ENZYMATIC METHYLATION

GAMBARYAN A. S., MOROZOV I. A., VENKSTERN T. V., KOZLOV L. V.

Institute of Molecular Biology and M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The kinetics of individual tRNA methylation catalyzed by 2000-fold purified *m*⁵A-methyltransferase from *Thermus flavus* have been measured. With all tRNAs under study — Ser, Asp from yeast, and f-Met, Val, Phe from *E. coli* — inhibition of the methylation rate was observed at high concentrations of tRNA (from 3 to 30 μM for different tRNAs). No substrate inhibition was detected in the case of tRNA₂^{Glu} methylation with the enzyme from *Thermus flavus*. The results of a detailed kinetic analysis of tRNA^{Ser} methylation suggest that substrate inhibition is caused by an ordered mechanism of substrate attachment, that is the complexes methylase-tRNA and methylase-S-adenosylhomocysteine-tRNA are dead-end ones.