

МІЖГАЛУЗЕВИЙ НАУКОВО - ІНЖЕНЕРНИЙ ЦЕНТР З ФІЗИКИ  
ЛИВОГО І МІКРОХВИЛЬОВОЇ РЕЗОНАНСНОЇ ТЕРАПІЇ "ВІДГУК"  
ПРИ КАБІНЕТІ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ

На правах рукопису

Клименко Ілона Вікторівна

ДОСЛІДЖЕННЯ КОНФОРМАЦІЙНОЇ РУХЛИВОСТІ  
ЕУКАРІОТИЧНОЇ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕЗАзи У  
РОЗЧИНІ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ  
СПЕКТРОСКОПІЇ

Спеціальність 03.00.02 - біофізика

Автореферат на здобуття наукового ступеня  
кандидата фізико-математичних наук

Київ - 1994



00778648 (1)

## Дисертація

Робота виконана у відділі  
кислот Інституту молекулярної біології

## Наукові керівники:

кандидат фізико-математичних наук,  
доцент Г. С. Литвинов;  
кандидат біологічних наук О. І. Корнелюк.

## Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,  
професор С. М. Храпунов;  
доктор фізико-математичних наук,  
професор В. В. Обуховський.

Провідна установа: Інститут фізики АН України

Захист відбудеться "8" серпня 1994 року о 14 годині  
на засіданні спеціалізованої ради для захисту докторських  
дисертацій Д-173. 01. 01 у Міжгалузовому науково-інженерному  
центрі "Відгук" при Кабінеті міністрів України за адресою:  
252601, м. Київ-17, вул. Володимирська, 61-б.З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Міжгалузового  
науково-інженерного центру "Відгук" при Кабінеті міністрів  
України.Автореферат розісланий "6" гравня 1994 рокуВчений секретар  
спеціалізованої ради

Г. С. Литвинов

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

AB-30.069

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Однією з актуальних проблем сучасної фізики живого є вивчення динаміки білкових макромолекул. До них належать, зокрема ферменти аміноацил-тРНК синтетази, що каталізують специфічне утворення аміноацил-тРНК, які в свою чергу детермінують процес зборки білкових молекул на рибосомах /Кисельов Л.Л. і співавт., 1984/. Механізм функціонування аміноацил-тРНК синтетаз, що забезпечують молекулярне пізнавання і пов'язану з ним високоточну реалізацію генетичної інформації в процесі біосинтезу білка, залишається ще й досі повністю не визначеним. Тепер проблема досліджень пізнавання аміноацил-тРНК синтетазами гомологічних тРНК має два основних аспекти: визначення ділянок контакту транспортної рибонуклеїнової кислоти (тРНК) і аміноацил-тРНК синтетаз (АРСааз) і встановлення структурних детермінант, що забезпечують таке пізнавання; вивчення конформаційних змін в АРСаазах і тРНК в процесі їх взаємного пізнавання.

Слід підкреслити, що саме друга стадія процесу пізнавання тРНК АРСаазами - взаємна конформаційна підстройка синтетази і гомологічної тРНК - забезпечує високу специфічність реакції аміноацилювання. Згідно з сучасними уявленнями /Блюменфельд Л.А., 1982/ функціональні властивості ферментів можуть бути адекватно описані з точки зору їх динаміки в розчині. Механізм дії ферментів визначається їх здатністю до флукутацій конформації макромолекули, скоректованих у часі /Caregi G., 1974/. Отже, для розуміння і побудови механізму функціонування АРСааз необхідні вивчення і опис їх динамічних властивостей у розчині. Розробка цієї проблеми особливо актуальна для АРСааз вищих еукаріот, у котрих останні схожі за своїми структурою і властивостями з АРСаазами людського організму.

Мета і завдання роботи. Мета роботи полягала у вивченні конформаційної рухливості і флукутацій макромолекули тирозил-тРНК синтетази на моделі ферменту з печінки бика в розчині у вільному стані і при зв'язуванні різних лігандів. Основні завдання роботи:

1. Дослідити параметри спектрів флуоресценції тирозил-тРНК синтетази в розчині. Визначити, якими ароматичними амінокислотними залишками спричинена флуоресценція молекули синтетази, число і локалізацію хромофорів у білковій матриці.

2. Вивчити внутрішньомолекулярну рухливість макромолекули ферменту методом температурного динамічного гасіння флуоресценції. Визначити енергії активації і фізичні процеси регуляції досліджуваного явища.

3. Дослідити конформаційну рухливість тирозил-тРНК синтетази, її часові і просторові характеристики методом гасіння флуоресценції низькомолекулярними зарядженими і нейтральними гасниками.

4. Оцінити амплітуду конформаційних флуктуацій макромолекули тирозил-тРНК синтетази за характеристиками безвипромінювального переносу енергії збудження між триптофановими залишками ферменту і флуоресцентною міткою - пиридоксаль-5'-фосфат, розташованої в активному центрі синтетази.

5. Визначити конформаційні зміни структури білкової матриці ферменту при взаємодії з специфічними для нього субстратами (АТР, тирозин, тирозиладенілат і тРНК), використовуючи характеристики безвипромінювального переносу енергії збудження між триптофановими залишками ферменту і флуоресцентним зондом - N [(йодацетил)аміно] етил-5-нафтиламіно-1-сульфокислота, введеним у білкову матрицю.

Основні положення, що винесені до захисту:

1. Флуоресценція тирозил-тРНК синтетази обумовлена в основному триптофановими залишками. Одну з двох компонентів спектру випромінювання ферменту забезпечують внутрішньоглобулярні триптофанили, а другу - експоновані до розчинника триптофанові залишки, розташовані в поверхневих шарах білкової матриці.

2. Для тирозил-тРНК синтетази характерні швидка конформаційна рухливість, яка залежить від дифузійних властивостей розчинника і має низькі енергії активації.

3. Взаємодія тирозил-тРНК синтетази з гомологічними субстратами супроводжується конформаційними змінами структури ферменту і посиленням ефективності переносу енергії збудження від залишків триптофану до флуоресцентного зонду.

Наукова новизна і практична цінність роботи. Вперше проведено детальний аналіз спектрів власної флуоресценції еукаріо-

тичної тирозил-ТРНК синтетази у розчині і виявлено, що внесок в спектр флуоресценції при збудженні на довжині хвилі 296 нм роблять триптофанові залишки. При збудженні на довжині хвилі 280 нм максимум спектру флуоресценції зсувається на 3 нм в короткохвильову ділянку завдяки флуоресценції тирозину, яка складає біля 5 % від загального спектру випромінювання.

Показана наявність двох компонент в спектрі триптофанової флуоресценції синтетази, одна з котрих належить внутрішньоглобулярним триптофановим, а друга - експонованим триптофановим залишкам. Визначені величини квантового виходу триптофанової флуоресценції, часу життя збудженого стану, поляризації флуоресценції, ефективності міграції енергії збудження між хромофорами ферменту. Для тирозил-ТРНК синтетази в розчині вивчені і визначені просторові і часові характеристики конформаційної рухливості макромолекули у вільному стані і при взаємодії в субстратами.

Результати роботи мають теоретичне значення в аспекті з'ясування механізмів забезпечення високоточної реалізації генетичної інформації в процесах біосинтезу білка.

Апробація роботи. Матеріали доповідалися на Всесоюзній конференції по спектроскопії біополімерів (Харків, 1991), Всесоюзній координаційній нараді по спектроскопії полімерів (Мінськ, 1989), Всесоюзній нараді "Люмінесцентний аналіз в медицині і біології та його апаратурне забезпечення" (Москва, 1992), Міжнародному симпозиумі по оптичній спектроскопії (Німеччина, Ньюбрандербург, 1990), 22-ій Міжнародній конференції ФЕБС (Швеція, Стокгольм, 1993), Міжнародній робочій нараді по ТРНК (Франція, Кап Даг, 1993), а також на семінарах відділів Інституту фізики АН України та Інституту молекулярної біології і генетики АН України.

Публікації. Основні результати роботи викладені в 10 публікаціях, у тому числі: 4 статтях у вітчизняних журналах і 6 тезах доповідей Всесоюзних і Міжнародних конференцій і симпозиумів.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація обсягом **120** сторінок машинописного тексту містить вступ, огляд літератури,

матеріали і методи досліджень, результати і їх обговорення, висновки, список літератури і список авторських робіт. Дисертація ілюстрована 7 таблицями і 26 малюнками. Список літератури на 17 сторінках включає 140 найменувань.

#### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

У першій главі подано огляд літератури з теми досліджень. З нього випливає, що флуоресцентна спектроскопія дозволяє одержати унікальну інформацію про структурний стан власних хромофорів білка - залишків тирозину і триптофану, які є природними репортерними групами у білкових макромолекулах. Використання конкретних параметрів флуоресценції (квантовий вихід, положення і форма спектрів) дає можливість вивчити полярність оточення хромофорів, релаксаційну рухливість в локальних ділянках структури, наявність гасячих груп тощо.

Відмічається, що параметри власної флуоресценції білків суттєво змінюються при їх взаємодії з різними лігандами, наприклад, при утворенні фермент-субстратних комплексів. Разом з тим аналіз даних літератури показує, що і до тепер ще не проводилось детальне дослідження зв'язку параметрів флуоресценції і динамічних властивостей АРСаз. Дослідження флуоресценції в цьому напрямку обмежувалися головним чином вимірюванням кривих її гасіння при зв'язуванні субстратів і визначенням параметрів останнього.

У другій главі описані матеріали і методи досліджень.

В роботі використовували препарати функціонально активної тирозил-ТРНК синтетази з печінки бика. Вона є димером  $\alpha_2$ -типу і має молекулярну масу  $2 \times (59.0 \pm 1.5)$  кДа. Всі процедури по виділенню ферменту проводили при температурі  $+4^\circ\text{C}$  в присутності двох інгібіторів протеаз - фенілметилсульфонілфторида і діізопропілфторфосфата. Схема виділення детально описана в роботі Корнелюка О.І. і співавт. / 1988/. Чистота препаратів ферменту складала за даними аналітичного гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності 0.1% розчину додецилсульфату натрія не менше 92%. Флуоресцентну спектрофотометрію препаратів тирозил-ТРНК синтетази проводили в розчині ка-

лій-фосфатного буферу, рН 7.5, що містив 2.3 мМ  $MgCl_2$ , 0.2 мМ дитіотреїтолу, 10 % гліцерину.

Препарати тРНК<sup>Tyr</sup> одержували з тканини печінки бика шляхом послідовної хроматографії на ВD-целюлозі при рН 4.5 (в присутності 10 мМ  $MgCl_2$ ) і рН 4.5 (за відсутності  $MgCl_2$ ), питома активність складала 900 пікоМоль [<sup>14</sup>C]-тирозину на одиницю A<sub>260</sub>. Використовували також препарати тРНК<sup>Tyr</sup> з E.coli ("Boehringer Mannheim", Німеччина).

В роботі використані: флуоресцентна спектроскопія, динамічне гасіння флуоресценції низькомолекулярними гасниками і власними угрупованнями білкової матриці, поляризації флуоресценції, характеристики безвипромінювального переносу енергії збудження між донором і акцептором, спектроскопія поглинання в УФ і видимому діапазоні. Спектри збудження, емісії, ступеня поляризації, часу життя збудженого стану реєструвались на спектрофлуориметрах "Hitachi Model 850" (Японія) і "SLM-4800" (США). Спектрофотометрію у видимому і УФ діапазонах проводили на спектрофотометрі "Specord UV-VIS" (Німеччина). У всіх вимірах проводили корекцію на спектральну чутливість приладу. Час життя визначали на фазово-модуляційному спектрофлуориметрі "SLM-4800" (США) при частоті модуляції 30 МГц згідно з Лаквич Дж./ 1986/.

Всі флуоресцентні виміри проводили в кварцевих прямокутних мікрокуветах 0.5 x 0.5 см у термостатованому кюветотримачі. Температуру визначали хромідь-алюмільовою термопарою з точністю  $\pm 0.1$  °C.

При вимірах інтенсивностей флуоресценції враховувались відомі оптичні ефекти екранування і реабсорбції, які спричиняють похибки при таких дослідженнях /Паркер С., 1972/.

Зміст третьої глави становлять результати досліджень і їх обговорення.

### 1. Параметри флуоресценції макромолекули еукаріотичної тирозил-тРНК синтетази.

Вимірні спектри флуоресценції макромолекули тирозил-тРНК синтетази при довжинах хвиль збудження 280 і 296 нм. Показано, що флуоресценція синтетази обумовлена випромінюванням як тиро-

винових, так і триптофанових залишків при збудженні в максимумі спектра поглинання (280 нм). При збудженні на довжині хвилі 296 нм в спектрі флуоресценції ферменту присутня тільки триптофанова компонента. Різниця в положенні максимумів спектрів при збудженні на 280 і 296 нм обумовлена присутністю тирозинової флуоресценції, яка становить біля 5 % від загального спектру випромінювання [2].

Розраховані нами на основі експериментальних даних параметри власної флуоресценції молекули ферменту представлені в табл.1.

Таблиця 1. Параметри власної флуоресценції тирозил-тРНКсинтетази з печінки бика при T=20 °C при збудженні флуоресценції на довжинах хвиль 280 і 296 нм.

Параметр	Довжина хвилі збудження	
	$\lambda_{ex}$ -280 нм	$\lambda_{ex}$ -296 нм
Положення максимуму спектра $\lambda_m$ , нм	335 ± 1	338 ± 1
Ширина спектру $\Delta\lambda$ , нм	56 ± 1	55 ± 1
Квантовий вихід, $\phi$	0.24±0.01	0.25±0.01
Ефективність переносу енергії триптофан-тирозин	0.85 ± 0.10	

## 2. Визначення кількості триптофанових залишків і їх локалізації в молекулі тирозил-тРНК синтетази.

Оскільки флуоресценція ферменту обумовлена практично триптофановими залишками, то доцільним було визначити кількість хромофорів і їх локалізацію в білковій матриці. Кількість триптофанових залишків визначали згідно методу /Rajot P., 1976/. Виявилось, що у молекулі ферменту міститься  $6 \pm 0.9$  триптофанових залишків на одну субодиницю [2].

Поряд з загальною кількістю флуоресціюючих центрів іншою

характеристикою макромолекули є їх локалізація в білковій глобулі. Для визначення локалізації хромофорів (триптофанових залишків) в молекулі ферменту проведено розкладання спектрів триптофаної флуоресценції по  $\log$ -нормальних кривих методом найменших квадратів за алгоритмом, розробленим /Аборнев С.М., Бурштейн Е.А., 1992/. Цей алгоритм передбачає використання ряду регуляризованих факторів: набір спектрів флуоресценції, вимірних в присутності гасників; в функціонал мінімізації включений член, залежний від виконання закону Штерна-Фольмера; масив експериментальних точок в розрахунку значно перевищує число шуканих параметрів. Виявилось, що спектри випромінювання ферменту, розкладені за даним алгоритмом на дві компоненти, належать класам внутрішньоглобулярним і експонованим триптофанових залишкам (у випадку гасіння KI і акриламідом). Положення максимумів спектрів випромінювання цих класів хромофорів відповідають довжинам хвиль  $330 \pm 1$  і  $344 \pm 1$  нм. При цьому значення однакові для експериментального набору спектрів, вимірних в присутності як KI, так і акриламиду.

Таким чином, флуоресцюючі центри, розташовані усередині і зовні білкової макромолекули, є природними флуоресцентними мітками в структурі тирозил-тРНК синтетази, що дозволяють вивчати внутрішньомолекулярну динаміку ферменту.

### 3. Внутрішньомолекулярна динаміка макромолекули тирозил-тРНК синтетази, що реєструється по температурному гасінню триптофаної флуоресценції.

Відомо, що в білкових молекулах містяться групи атомів, котрі гасять флуоресценцію хромофорів при найближчому контакті з ними. Власними гасниками флуоресценції біомакромолекул є: карбонильна група пептидного зв'язку, бокові радикали, кінцеві карбонильна і аміногрупи та імідазол гістидину /Бурштейн Е.А., 1976/. Для динамічного гасіння необхідна певна рухливість оточення хромофорів.

Індуковане температурою гасіння флуоресценції тирозил-тРНК синтетазою було вивчено шляхом виміру параметрів флуоресценції ферменту в діапазоні  $+18 - +75$  °C [2,10]. Температурна залежність положення максимуму спектру флуоресценції показує, що

в межах температур до  $+ 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  зберігається нативна конформація білка, тобто структура синтетази є стабільною, про що свідчить незмінність положення максимуму спектру в цьому температурному інтервалі. В діапазоні температур  $+ 40 - + 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  спостерігається зрушення максимуму на  $3\text{ нм}$  в довгохвильову ділянку. Використовуючи дані про температурну залежність максимуму спектру випромінювання тирозил-тРНК синтетази при збудженні на хвилях  $280$  і  $296\text{ нм}$  і вважаючи, що спектральні зміни в інтервалі  $+ 20 - + 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  визначаються дипольною реорієнтаційною релаксацією оточення триптофанових залишків у ферменті, були визначені часи дипольної орієнтаційної релаксації в даному температурному інтервалі. При цьому користувались відповідним рівнянням з роботи /Демченко О.П., 1986/. Розраховані часи релаксації змінюються в межах  $7 - 12\text{ нс}$  в діапазоні температур  $+ 20 - + 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Лінійність залежності часу релаксації від температури в координатах Арреніуса свідчить про активаційний характер дипольно-орієнтаційної рухливості оточення триптофанових залишків в молекулі синтетази. Величина енергії активації, оцінена за тангенсом кута нахилу прямої, становить  $14 \pm 3\text{ кДж/моль}$ .

При встановленні залежності квантового виходу від температури як Арреніусовської, була визначена енергія активації процесу гасіння флуоресценції, що становила  $21 \pm 4\text{ кДж/моль}$ . Представляючи температурну залежність квантового виходу в координатах  $1/q = a + b T/\eta$  /Бурштейн Е.А. і співавт., 1978/, ми припускали, що динаміка білкових груп, враховуючи і внутрішні, залежить від коефіцієнта дифузії розчинника, і тому квантовий вихід білка пропорційний  $T/\eta$  ( $\eta$  - в'язкість розчинника). Отримані нами криві лінійні в межах температур до  $+ 40^{\circ}\text{C}$  (тут зберігається нативна конформація білка, нема спектральних зрушень спектру флуоресценції). Відхилення від лінійності при температурах, вищих за  $+ 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , пов'язане, очевидно, з збільшенням температурно-індукованої рухливості окремих частин білкової молекули і числа їх ступенів свободи, що приводить до денатурації білкової глобули. У випадку переходу білка з нативної конформації в денатуровану необхідні великі енергії активації (десятки кДж/моль) для розриву сил внутрішньомолекулярних вза-

емодій, які стабілізують глобулярну структуру ферменту. Ці процеси носять переважно активаційних характер.

Отже, результати наших досліджень показали [2,10], що для внутрішньомолекулярної рухливості тирозил-тРНК синтетази при температурі до + 40 °С характерні низькі енергії активації і опосередкована регуляція дифузійними характеристиками розчинника [2,10]. Це справедливо як для поверхневих, так і для внутрішніх ділянок макромолекули.

#### 4. Конформаційна рухливість тирозил-тРНК синтетази, що реєструється методом гасіння флуоресценції низькомолекулярними гасниками.

Нами показано незначне зменшення інтенсивності флуоресценції при додаванні в білковий зразок йодиду [1]. Це дозволяє припустити, що йодид контактує тільки з невеликою частиною триптофанових залишків, розташованих на поверхні молекули тирозил-тРНК синтетази, а основна частина триптофанів міститься усередині білкової матриці і для йодиду недоступна.

Експериментальні залежності інтенсивності флуоресценції синтетази від концентрації акриламідру мають характерні особливості зіткнувального механізму гасіння флуоресценції [7,8]. Лінійність графіка в координатах Лерера свідчить про те, що за доступністю акриламідру в тирозил-тРНК синтетазі можуть бути виділені два типи триптофанових залишків - доступні і повністю недоступні. Результати розрахунків параметрів гасіння флуоресценції молекули ферменту акриламідом за рівнянням Лерера /Lehger S.S., 1971/ наведені в табл.2.

Одержані нами значення [1,7,8] константи гасіння ( $13.2$  (моль/л)<sup>-1</sup>) значно менші від таких для вільного триптофану у воді ( $18.0$  (моль/л)<sup>-1</sup> /Lehger S.S., 1971/).

Для в'ясування механізму гасіння досліджена залежність ефективності гасіння флуоресценції акриламідом від в'язкості розчинника [1]. Останнє досягалось додаванням у розчин гліцерину з масовим вмістом - 0; 10; 25 і 50 %. Як видно з табл.2, при збільшенні в'язкості розчинника константа гасіння зменшується, а доля доступності залишається незмінною.

Якщо взяти до уваги, що гасіння можливе при зіткненні хро-

мофора і гасника, то залежність ефективності гасіння від в'язкості розчинника, може означати, що доступна для гасника частина триптофанів знаходиться в контактi з гасником впродовж часу життя збудженого стану хромофора - близько  $10^{-9}$  с.

Разом з тим, як вже згадувалось, доля флуоресценції поверхневих триптофанів в тирозил-тРНК синтетазі мала. Це дозволяє думати, що доступні акриламиду триптофани, що забезпечують біля 74 % сумарної інтенсивності флуоресценції (табл.2), очевидно, розташовані усередині білкової матриці. При цьому контакт акриламиду з триптофанами може бути здійснений завдяки масштабним флуктуаціям білкової структури, що вводять її в стан з відкритою і закритою порожниною для розчинника [1].

Таблиця 2. Залежність константи Штерна-Фольмера ( $K^{SV}$ ) і відносної доступності триптофанових залишків тирозил-тРНК синтетази ( $\alpha$ ) для гасіння флуоресценції акриламідом від в'язкості розчинника.

Вміст гліцерину, %	В'язкість розчинника $\eta, 10^3$ Па·с	$K^{SV}$ М <sup>-1</sup>	$\alpha$
0	0.895	13.2	0.74
10	1.249	10.0	0.74
25	1.805	7.5	0.74
50	5.024	4.5	0.74

Встановлена залежність константи швидкості бімолекулярної реакції гасіння флуоресценції триптофанових залишків акриламідом від температури в координатах Арреніуса. Ця залежність лінійна і, можливо, свідчить про те, що процес переходу білка з одного стану в інший носить активаційний характер і відбувається при енергії активації  $10 \pm 3$  кДж/моль. Зміна цих станів відбувається впродовж  $10^{-9}$ с і впливає на ефективність гасіння флуоресценції у відповідності з рівнянням, запропонованим Демченко О.П. / 1988/.

Таким чином, результати досліджень гасіння триптофанової флуоресценції низькомолекулярними гасниками свідчать про наявність швидкої (наносекунди) конформаційної рухливості молекули тирозил-тРНК синтетази в розчині, яка приводить білкову матрицю в стан з відкритою і закритою порожниною для розчинника.

#### Б. Обертальна рухливість триптофанових залишків в молекулі тирозил-тРНК синтетази.

Проведено дослідження спектральної залежності ступеня поляризації ( $P$ ) флуоресценції і часу життя збудженого стану ( $\tau$ ) по спектру триптофанової флуоресценції тирозил-тРНК синтетази. В короткохвильовій ділянці спектру випромінювання  $P$  максимальна і становить 0,240 ( $\lambda_{ex}$ -286 нм) і 0,375 ( $\lambda_{ex}$ -300 нм) на довжині хвилі 315 нм [3,9]. Із збільшенням довжини хвилі випромінювання спостерігається монотонне зниження  $P$  по спектру флуоресценції і на довжині хвилі 380 нм має значення 0,02 і 0,15 при  $\lambda_{ex}$ -286 нм і  $\lambda_{ex}$ -300 нм, відповідно.

За таких же умов спостерігається, навпаки, збільшення часу життя збудженого стану. Такий при довжині хвилі 315 нм становив  $2.16 \pm 0.5$  нс, а при довжині хвилі 380 нм -  $2.85 \pm 0.5$  нс [3]. Подібна закономірність поведінки  $\tau$  і  $P$  стосовно спектра флуоресценції характерна для мультитриптофанмістячих білків /Векшин М.Л., 1987/.

Для тирозил-тРНК синтетази можна виділити три види рухливості, що деполяризують флуоресценцію: самих залишків триптофану, окремих сегментів ферменту з триптофановими залишками і ферменту як цілого при його обертальній дифузії [3,9]. Але, враховуючи час життя збудженого стану (наносекунди), головним фактором, що приводить до деполяризації в довгохвильовій ділянці спектру флуоресценції, є обертальна рухливість триптофанових залишків і їх локального мікрооточення в білковій матриці.

Знаючи значення  $P$ , можна визначити кут обертання триптофанових залишків за час життя збудженого стану флуоресценції. Наприклад, при  $P = 0.29$  при  $\lambda_{ex}$ -300 нм в максимумі спектра флуоресценції, використовуючи відповідну формулу /Лакович Дж., 1980/, знаходимо, що  $\theta = -27^\circ$ . Цей результат свідчить про

досить високу обертальну рухливість триптофанових залишків під час життя їх збудженого стану за умов значної внутрішньобілкової мікрово'язкості тирозил-тРНК синтетази в наносекундному діапазоні, котра складає біля 0.5 Па·с [3].

Отже, наявність спектральної неоднорідності, зокрема, залежності збудженого стану хромофорів, пов'язана з неоднорідністю розподілу і локалізації триптофанових залишків в білковій матриці ферменту, а також з різним мікрооточенням внутрішньоглобулярних і експонованих триптофанілів.

#### 6. Локальні конформаційні флуктуації молекули тирозил-тРНК синтетази.

Амплітуду конформаційних флуктуацій макромолекули тирозил-тРНК синтетази в розчині вивчали з використанням характеристик безвипромінювального переносу енергії збудження між триптофановими залишками (донор) і пиридоксаль-5'-фосфатом міченими залишками лізину, розташованими в активному центрі ферменту (акцептор).

В наших дослідах ефективність переносу енергії від донора до акцептора, визначена згідно формули /Stryer S.S., 1978/, становила близько 94 %. Величина Фьорстеровського радіусу досягала для цієї пари донор-акцептор 32 Å. Удавана відстань між донором та акцептором дорівнювала  $19 \pm 1$  Å [6].

При збільшенні температури до + 40 °C ефективність переносу зросла до  $96 \pm 2$  %. Амплітуди локальних конформаційних флуктуацій молекули тирозил-тРНК синтетази у розчині оцінювали за параметром  $f$  з роботи Somogyi et al. /1984/, який є відношенням ефективності переносу енергії збудження між донором і акцептором до квантового виходу донорної флуоресценції. Параметр  $f$  пов'язаний з відношенням  $r/R$  ( $r$  - амплітуда флуктуацій акцептора навколо положення рівноваги,  $R$  - відстань донор-акцептор).

Дослідження температурної залежності параметра  $f$  показало, що останній зростає на  $36 \pm 3$  % при збільшенні температури до + 40 °C. Якщо за початкові умови прийняти  $V_0 = 2.5$  Å /Fraenfelder H. et al., 1979/, то амплітуда флуктуацій акцеп-

гора біля положення рівноваги варіює в межах 0.5 - 2.8 Å [6]. Така конформаційна рухливість модулює, напевне, конформаційні зміни при взаємодії з гомологічною тРНК<sup>Tyr</sup> і в процесі реакції аміноацилювання.

#### 7. Конформаційні зміни тирозил-тРНК синтетази при утворенні тирозиладенілату та взаємодії з гомологічною тРНК.

Другим етапом роботи було вивчення конформаційних змін тирозил-тРНК синтетази при взаємодії з субстратами: АТР, тирозином, проміжним продуктом тирозиладенілатом, гомологічною тРНК<sup>Tyr</sup>. Для дослідження таких змін застосували метод резонансного переносу енергії збудження за механізмом Фюрстера з триптофанових залишків на ковалентно приєднаний флуоресцентний зонд АЕДАНС [4,5].

Зміни переносу енергії збудження від триптофанових залишків (донор) до ковалентно приєднаного АЕДАНС (акцептор) оцінювали за: 1) зниженням інтенсивності і квантового виходу флуоресценції донора в присутності акцептора - ефекти гасіння; коефіцієнти розведення, екранування і реабсорбції розчину ферменту були враховані; 2) незмінністю форми спектру випромінювання донора при гасінні; 3) виникненню одночасно з гасінням сенсibiliзованої флуоресценції акцептора і 4) появою в спектрі збудження акцептора смуги донора, інтенсивність котрої пропорційна ефективності переносу енергії.

Ефективність переносу енергії від донора до акцептора (E) дорівнювала  $81 \pm 2\%$ , що визначено згідно формули /Stryer L., 1978/. Величину Фюрстеровського радіуса (відстань напівпереносу енергії збудження ( $R_0$ )) визначали за формулою /Forster Th., 1965/. Вона становила для нашої пари донор-акцептор  $35 \pm 1$  Å.

В подальших дослідженнях залежності інтенсивності флуоресценції зв'язаного з ферментом АЕДАНС показано, що при взаємодії його з АТР і тирозином спостерігається звичайне гасіння зондової флуоресценції, а саме на  $27 \pm 3\%$  у випадку з тирозином і на  $22 \pm 3\%$  при взаємодії з АТР. Однак, при взаємодії АЕДАНС-міченого ферменту з проміжним

продуктом - тирозиладенілатом спостерігається протилежна картина: флуоресценція зв'язаного зонду різко підсилюється (на  $34 \pm 3\%$ ). При цьому ефективність переносу енергії збудження з триптофанових залишків на флуоресцентний зонд зростає від 81 до 90%. Відстань донор-акцептор скорочується з 27.4 до 24.4 Å. При взаємодії з неспецифічним субстратом фенілаланіном не спостерігається підвищення інтенсивності флуоресценції зонду [5].

Результати розрахунків ефективності переносу енергії, Фьорстеровського радіуса і удаваної відстані між донором (триптофанові залишки ферменту) і акцептором (ковалентно зв'язаний зонд АЕДАНС) представлені в табл.3. З цих даних видно, що тирозил-тРНК синтетаза зазнає конформаційних змін - стиск білкової глобули - при взаємодії лише з специфічним проміжним продуктом тирозиладенілатом. Таке стискання білкової матриці очевидно сприяє найбільш оптимальній конформації синтетази для перебігу ферментативної реакції [5].

Дослідження показали, що взаємодія ферменту з гомологічною тРНК<sup>Tyr</sup> приводить до збільшення флуоресценції зв'язаного зонда АЕДАНС на  $25 \pm 3\%$ , тоді як при взаємодії з гетерогенною тРНК<sup>Tyr</sup> з *E.coli*, котра не аміноацилюється ферментом печінки бика, спостерігається гасіння зондової флуоресценції на  $8 \pm 3\%$ . Підсилення зондової флуоресценції відбувається, очевидно, за рахунок збільшення ефективності переносу енергії збудження з триптофанових залишків на АЕДАНС (від 81 до 87%). Відстань між триптофанами і зондом зменшилась до 25.3 Å при взаємодії з гомологічною тРНК<sup>Tyr</sup> [4].

Нами вивчені залежності інтенсивності зондової флуоресценції комплексів міченої АЕДАНС тирозил-тРНК синтетази з гомологічною і гетерологічною тРНК<sup>Tyr</sup> від концентрації АТР. Так, при додаванні АТР до комплексу ферменту з гомологічною тРНК<sup>Tyr</sup> спостерігається збільшення зондової флуоресценції на  $32 \pm 3\%$ , а у випадку з додаванням гетерологічної тРНК<sup>Tyr</sup> - лише на  $6 \pm 3\%$ .

Відстань між триптофановими залишками і зв'язаним зондом АЕДАНС в комплексі з гомологічною тРНК<sup>Tyr</sup> і АТР становила 24.1 Å, ефективність переносу енергії при цьому зросла з 81 до 90% (табл.3) [4].

Таблиця 3. Флуоресцентні властивості AEDANS-міченої тирозил-тРНК синтетази з печінки бика і її комплексів з субстратами.

	$\lambda_{\text{max}}$ (нм) ( $\pm 1$ )	E (%) ( $\pm 2$ )	$R_0$ (Å) ( $\pm 1$ )	R (Å) ( $\pm 1$ )
АЕДАНС-ТирРС	477	81	35.0	27.4
АЕДАНС-ТирРС+тРНК <sup>Tyr</sup> з печінки бика	477	87	35.0	25.3
АЕДАНС-ТирРС+тРНК <sup>Tyr</sup> з печінки бика + АТР	477	90	35.0	24.1
АЕДАНС-ТирРС+тРНК <sup>Tyr</sup> в E.coli	477	82	35.0	27.0
АЕДАНС-ТирРС+Тир+АТР	476	93	35.0	22.3
АЕДАНС-ТирРС+АТР+Тир	476	90	35.0	24.1
АЕДАНС-ТирРС+АТР+Фен	476	81	35.0	27.4
Вільний АЕДАНС	493			

Таким чином, одержані дані показують, що пізнавання тирозил-тРНК синтетази гомологічною тРНК<sup>Tyr</sup> супроводжується конформаційними змінами (стиск) молекули ферменту, що приводить до посилення флуоресценції зонда внаслідок збільшення ефективності переносу енергії збудження від залишків триптофану. Така конформаційна зміна, очевидно, потім індукуює формування оптимальної конформації для зв'язування АТР в активному центрі синтетази. Подібний ефект недавно описаний для кристалів комплексу глютамініл-тРНК синтетази - тРНК<sup>Gln</sup> /Rould M., 1991/. Допускається, що взаємодії антикодону тРНК з рухливими фрагментами білка запускають конформаційні зміни, необхідні для послідовного зв'язування з АТР.

#### ВИСНОВКИ

1. Досліджені спектральні властивості триптофанової флуоресценції тирозил-тРНК синтетази з печінки бика. Показана на-

явність двох компонент в спектрі випромінювання ферменту, одна в котрих належить внутрішньоглобулярним триптофанилам (максимум спектру 330 нм), а друга - експонованим триптофановим залишкам (максимум спектру 344 нм).

2. Для внутрішньомолекулярної рухливості синтетази при температурі до 40 °С характерні низькі енергії активації (14 - 21 кДж/моль) і опосередкована регуляція дифузійними властивостями розчинника, що справедливо як для поверхневих, так і для внутрішніх ділянок макромолекули тирозил-тРНК синтетази.

3. В розчині тирозил-тРНК синтетаза здатна до швидкої (наносекундної) конформаційної рухливості її молекули, що приводить до стану відкритих і закритих порожнин для розчинника в білкової глобулі.

4. Для тирозил-тРНК синтетази характерна висока оберտальна рухливість триптофанових залишків за умов значної внутрішньої білкової мікрів'язкості ферменту.

5. Для молекули тирозил-тРНК синтетази спостерігаються локальні конформаційні флуктуації, амплітуда котрих коливається у межах 0.5 - 2.8 Å.

6. Пізнавання тирозил-тРНК синтетазою гомологічної тРНК супроводжується конформаційною зміною (стиском) структури ферменту, що спричиняє посилення флуоресценції зонду АЕДАНС, як наслідок збільшення ефективності переносу енергії збудження від залишків триптофану. Таке стискання потім індукує формування оптимальної конформації для зв'язування АТР в активному центрі синтетази. Утворення тирозиладенілату також супроводжується конформаційними змінами молекули ферменту.

#### Список опублікованих робіт по темі дисертації.

1. Наносекундная конформационная подвижность тирозил-тРНК синтетазы в растворе по данным тушения триптофановой флуоресценции /Т.О. Гуша, И.В. Клименко, А.И. Корнелюк// Докл. АН УССР. Сер. В. - 1990. - N 7. - С. 77-80.

2. Свойства триптофановой флуоресценции двух форм тирозил-тРНК

синтетазы из печени быка/И.В.Клименко, Т.О.Гуща, А.И.Корнелюк//Биополимеры и клетка.-1991.-т.7, N 6.-С.83-88.

3.Поляризация флуоресценции и вязкость микроокружения остатков триптофана эукариотической тирозил-тРНК синтетазы/И.В.Клименко//Биополимеры и клетка.-1992.-т.8, N 3.-С.3-6.

4.Конформационное изменение тирозил-тРНК синтетазы из печени быка при взаимодействии с гомологичной тРНК по данным флуоресцентной спектроскопии /И.В. Клименко, А.И.Корнелюк, Г.Х.Мацука//Биополимеры и клетка.-1993.-т.9, N 6.-С.29-33.

5.Conformational changes of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase in the course of tyrosyl adenylate formation and cognate tRNA binding revealed from fluorescence energy transfer measurements / A.I. Kornelyuk, I.V. Klimenko, L.G. Kalachnyuk, K.A.Odynets//Abstracts of 15th International tRNA Workshop, Cap d'Agde, France, May 30 - June 4, 1993.-P.344.

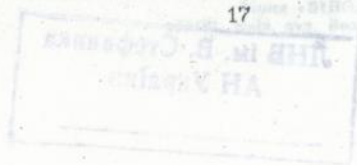
6.Conformation fluctuations of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase in solution studied by fluorescence spectroscopy / D.V. Gnatenko, I.V. Klimenko, A.I. Kornelyuk, K.A. Odynets //Abstracts of 22nd Meeting of the FEBS, Stockholm, Sweden, July 4-9, 1993.-P.190.

7.Конформационная подвижность полипептидной цепи тирозил-тРНК синтетазы по данным флуоресцентной спектроскопии/Т.О.Гуща, И.В.Клименко, А.И.Корнелюк//Тезисы докладов VI Всесоюзного координационного совещания по спектроскопии полимеров, Минск, 25-28 октября, 1989.-С.37.

8.Conformational mobility of polypeptide chain of tyrosyl-tRNA synthetase studied by fluorescence spectroscopy / I.V. Klimenko, T.O. Guscha, A.I. Kornelyuk // Abstracts of VI Symposium on Optical Spectroscopy, Neubrandenburg, DDR, 1990.-P.87.

9.Поляризация флуоресценции и вращательная подвижность остатков триптофана эукариотической тирозил-тРНК синтетазы/И.В.Клименко, А.И.Корнелюк//Тезисы докладов VI-го Всесоюзного совещания "Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратное обеспечение", Москва, 1992.-С.19-20.

10.Равновесная динамика тирозил-тРНК синтетазы по данным тем-



пературного тушения триптофановой флуоресценции/И.В.Клименко, А.И.Корнелюк//Тезисы докладов VII Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров, Харьков, 1991. - С.41.

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України







AB 30.069